

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dejan Bogojević

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dejan Bogojević

**Sinteza i optička karakterizacija novih
heteroaromatskih kromofora**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada:

v. pred. dr.sc. Lidija Furač

Članovi ispitnog povjerenstva: v. pred. dr.sc. Lidija Furač

doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

dr. sc. Nataša Perin

Zagreb, ožujak 2017.

***Hvala kolegama, prijateljima i obitelji na podršci, razumijevanju i strpljenju
tijekom mog studija.***

***Hvala svim zaposlenicima Zavoda za Opću i Anorgansku kemiju, Fakulteta
kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu na pristupačnosti i pruženoj
pomoći kad god je ona bila potrebna***

***Posebno Hvala mag. appl. chem. Emi Horak i dr. sc. Lidiji Furač, bez kojih
izrada ovog rada ne bi bila moguća***

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ) pod nazivom „*Design and Synthesis of Novel Nitrogen-Containing Heterocyclic Fluorophores and Fluorescent Nanomaterials for pH and Metal-Ion Sensing*“ (projekt HRZZ-3386, iNFiNiTE–SENS).

SAŽETAK

Cilj ovog rada je sinteza i optička karakterizacija novih derivata benzimidazola koji u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazolni prsten u svrhu određivanja njihove senzorske aktivnosti.

Novi spojevi 2-[(4-nitro)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **3**), 2-[(4-amino)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **5**), 2-[(4-azido)benz-2-ilidene)amino]benzimidazole (spoj **6**) i 2-{4-[(4-fenil)-1,2,3-triazol-1-il]benzilidenamino}benzimidazol (spoj **8**) uspješno su sintetizirani reakcijama klasične i „click“ kemije, dok spoj 2-{4-[4-(4-aminofenil)-1,2,3-triazol-1-il]benzilidenamino}benzimidazol **7** nije uspješno izoliran zbog preniske koncentracije i prevelikog broja nusprodukata. Strukture spojeva **3**, **5** i **8** potvrđene $^1\text{H-NMR}$ spektroskopijom

Detaljna karakterizacija fotofizičkih i kiselo-baznih svojstava u svrhu ispitivanja potencijalne primjene u optičkim kemijskim senzorima je provedena za spoj **3** i **8**. Spoj **3** je okarakteriziran UV-vidljivom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u otapalima različite polarnosti, univerzalnim puferima u rasponu vrijednosti pH od 1 do 13 te u prisustvu različitih metalnih iona. Također su provedena spektrofotometrijska ispitivanja spoja **8** u univerzalnim puferima pri graničnim vrijednostima pH te u prisustvu Zn^{2+} , Ag^+ i Al^{3+} iona.

Spoj **3** ima potencijalno djelovanje kao pH senzor, ali nije pokazao poželjna svojstva za uporabu u senzorima za metale. Spoj **8** je potrebno dodatno ispitati kako bi se definitivno zaključila njegova senzorska aktivnost.

Ključne riječi:

Fluorescencijski senzori, heteroaromatski kromofori, benzimidazol, UV-vidljiva spektrofotometrija, fluorescencija, „click“ kemija, 1,2,3-triazol

SUMMARY

The aim of this thesis was synthesis and optical characterization of novel benzimidazole derivatives which incorporate 1,2,3-triazole ring in their structure, to prove their sensing activity.

Compounds 2-[(4-nitro)benz-2-ylidene)amino]benzimidazole (compound **3**), 2-[(4-amino)benz-2-ylidene)amino]benzimidazole (compound **5**), 2-[(4-azido)benz-2-ylidene)amino]benzimidazole (compound **6**) and 2-{4-[(4-phenyl)-1,2,3-triazole-1-yl]benzylidenamino}benzimidazole (compound **8**) were successfully synthesized using a combination of classical organic chemistry synthesis and „click“ chemistry reaction, while compound 2-{4-[4-(4-aminophenyl)-1,2,3-triazole-1-yl]benzylidenamino}benzimidazole (compound **7**) was not successfully isolated due to low concentration and significant amount of impurities. Structures of compounds **3**, **4**, **5** and **8** were determined by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy.

Compound **3** was characterized with UV-visible and fluorescence spectrophotometry in solvents of different polarity, universal buffers in pH range 1 to 13 and in the presence of different metal ions. Compound **8** was spectrophotometrically characterized in marginal values of pH, and in the presence of Zn^{2+} , Ag^+ i Al^{3+} ions.

Compound **3** shows potential activity as a pH sensor in some solvents (water, acetone and acetonitrile), but it did not prove itself a good sensor for detecting metal ions. For compound **8**, additional experiments are needed to be sure about its sensor activity.

Key Words:

Fluorescence sensors, heteroaromatic chromophores, benzimidazole, UV-visible spectrophotometry, fluorescence, „click“ chemistry, 1,2,3-triazole

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. KEMIJSKI SENZORI.....	4
2.1.1. Optički kemijski senzori.....	6
2.1.1.1. Apsorpcija svjetlosti	6
2.1.1.2. Fluorescencija.....	7
2.2. HETEROAROMATSKI KROMOFORI	9
2.2.1. <i>Benzimidazolni kromoforski sustavi</i>	<i>9</i>
2.2.2. <i>π konjugirani sustavi</i>	<i>11</i>
2.2.3. <i>Triazoli</i>	<i>12</i>
2.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ZA ISPITIVANJE OPTIČKIH KEMIJSKIH SENZORA... 14	14
2.3.1. <i>UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija</i>	<i>14</i>
2.3.2. <i>Fluorescencijska spektrofotometrija.....</i>	<i>15</i>
2.3.2.1. Fluorescentni senzori.....	16
2.3.2.2. Mehanizmi prijenosa i stvaranja signala	17
2.4. „CLICK“ KEMIJA	19
2.4.1. <i>Cu (I) katalizirana 1,3-dipolarna Huisgenova cikloadicija (CuAAC).....</i>	<i>20</i>
2.4.1.1. Mehanizam CuAAC reakcije	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. OPĆE NAPOMENE.....	24
3.2. INSTRUMENTI	24
3.4. OPTIČKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 3 I 8.....	28
3.4.1. <i>Optička karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini</i>	<i>28</i>
3.4.2. <i>Utjecaj vrijednosti pH.....</i>	<i>28</i>
3.4.3. <i>Utjecaj metalnih iona</i>	<i>29</i>
3.4.4. <i>Utjecaj otapala</i>	<i>30</i>
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	31
4.1. SINTEZA SPOJEVA.....	32
4.1.1. <i>Priprava novih derivata benzimidazola 3-8</i>	<i>33</i>
4.1.1.1. Priprava novih derivata benzimidazola 3-5	33
4.1.1.2. Priprava novih derivata benzimidazola 6-8	37
4.2. SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 3 I 8 U OTOPINI.....	41

4.2.1. Utjecaj otapala	41
4.2.2. Utjecaj promjene pH vrijednosti	43
4.2.3. Utjecaji različitih metalnih iona.....	46
6. LITERATURA	51
7. ŽIVOTOPIS	56

1. Uvod

Kemijski senzori su uređaji koji imaju sposobnost pretvoriti kemijsku informaciju u koristan analitički signal [1]. Optički kemijski senzori su vrsta senzora kod kojih se analitički signal pobuđuje elektromagnetskim zračenjem određene energije. Okosnica analitičkog senzora je receptor, odnosno kemosenzorska molekula sposobna selektivno i specifično prepoznati određeni analit. Najčešće korišteni receptori u optičkim kemijskim sensorima su heteroaromatske strukture. Heteroaromatski kromofori su molekule koje imaju sposobnost promjene fotofizičkih svojstava u procesu prepoznavanja određenog analita. Strukturno gledano to su cikličke molekule koje u svojoj strukturi imaju barem jedan atom koji nije ugljik. Zbog visokog stupnja konjugiranosti ovakve molekule se vrlo često upotrebljavaju u dizajnu molekulskih senzora [2,3].

Priprava kemosenzorskih molekula uključuje dizajn, sintezu i karakterizaciju fotofizičkih i senzorskih svojstava. Jedan od novih načina priprave heteroaromatskih kromofora je „click“ sinteza. Pojam „click“ kemije prvi je upotrijebio K. Barry Sharpless kako bi opisao brze, jednostavne i efikasne reakcije koje tvore molekule spajanjem manjih jedinica u cjelinu. Sve reakcije „click“ kemije su termodinamički povoljne (egzotermne) te se odvijaju pri blagim reakcijskim uvjetima. Najpoznatija reakcija koja udovoljava konceptu „click“ kemije je Cu (I)-katalizirana azid-alkin cikloadicija, kojom se formira 1,2,3-triazolni prsten, vrlo važan strukturni dio u mnogim novim kemijskim sensorima. Sposobnost koordiniranja metalnih iona te delokalizirani elektroni u njegovoj strukturi omogućuju široku uporabu triazolnih derivata [4,5].

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija svojstava derivata benzimidazola koji u svojoj strukturi sadrže triazolni prsten, zajedno tvoreći konjugirani sustav za potencijalnu primjenu u fluorescentnim senzorskim sustavima. Fotofizička svojstva sintetiziranih spojeva su ispitana u različitim vrijednostima pH, u otapalima različite polarnosti te u interakciji sa različitim metalnim ionima.

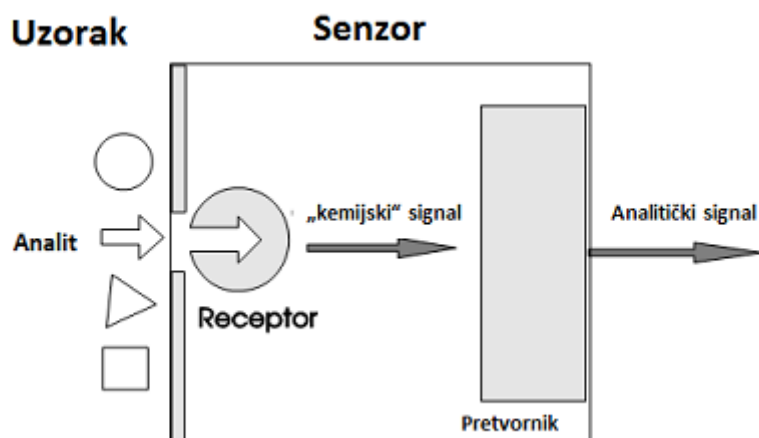
2. Opći dio

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji u realnom vremenu mogu dati kvalitativne i/ili kvantitativne informacije o prisutnosti određenog spoja ili iona u uzorku. U najjednostavnijem slučaju, senzor je postavljen u kontakt s uzorkom te je dobiven analitički signal koji se može preračunati u koncentraciju prisutnog analita. U idealnom slučaju, kemijski senzor je reverzibilan te ispitivani uzorak nije potrebno prethodno pročišćavati. Kako u većini slučajeva u mediju kojemu se nalazi analit postoje nečistoće, kemijski senzor mora biti selektivan na određenu tvar koju želimo kvalitativno i/ili kvantitativno odrediti [6,7,8].

Općenito, kemijski senzor obavlja funkcije za koje su zadužena dva glavna dijela senzora. Prva funkcija je prepoznavanje ciljanog spoja, analita. Tu ulogu obavlja dio senzora koji nazivamo receptorom. Druga uloga je „vizualizacija“ nastale veze između receptora i analita kako bi se dobio mjerljivi signal. Taj dio senzora nazivamo pretvornikom signala [9].

Pojednostavljena shema kemijskog senzora prikazana je na **Slici 1**.



Slika 1. Shematski prikaz kemijskog senzora [10]

S obzirom na princip rada pretvornika signala, kemijski senzori se dijele na:

- Optičke kemijske senzore – mjerenje promjena optičkih svojstava sustava
- Elektrokemijske senzore – mjerenje efekata elektrokemijskih interakcija između receptora i analita. Takve interakcije mogu biti spontane ili stimulirane.
- Električne senzore – signal dolazi od promjene u električnim svojstvima analita izazvanih njegovom interakcijom, ali uz uvjet da analit ne sudjeluje u elektrokemijskoj reakciji.
- Senzore osjetljivi na promjenu u masi – receptor je specijalno modificirana površina na koju se veže analit te mijenja svojstva te površine ovisno o akumuliranoj masi analita. Mjerljivi signal je npr. frekvencija.
- Magnetske senzore – mjeri paramagnetična svojstva analita. Ovi senzori se koriste isključivo u plinovitoj fazi.
- Termometrijske senzore – temelji se na mjerenju oslobođene ili utrošene topline u nekoj kemijskoj reakciji u kojoj sudjeluje i analit [11]

Za razliku od analitičke kemije koja kemijski senzor smatra analitičkim uređajem, u mnogim znanstvenim područjima senzor se jednostavno odnosi na – molekulu. Molekulski senzori su organske molekule koje imaju sposobnost selektivnog vezanja jedne (ili više) ionskih ili molekulskih vrsta na sebe. Prilikom vezanja ciljane vrste na receptorsku molekulu, dolazi do promjene elektrokemijskih ili spektroskopskih svojstava nastalog kompleksa. Analitičkim ispitivanjem nastalih promjena, moguće je kvalitativno i/ili kvantitativno odrediti vezanu vrstu [12].

2.1.1. Optički kemijski senzori

Temelj na kojemu rade optički kemijski senzori je interakcija elektromagnetskog zračenja i materije što rezultira promjenom svojstava zračenja, kao što je intenzitet zračenja, polarizacija svjetlosti ili promjena brzine svjetlosti u određenom mediju.

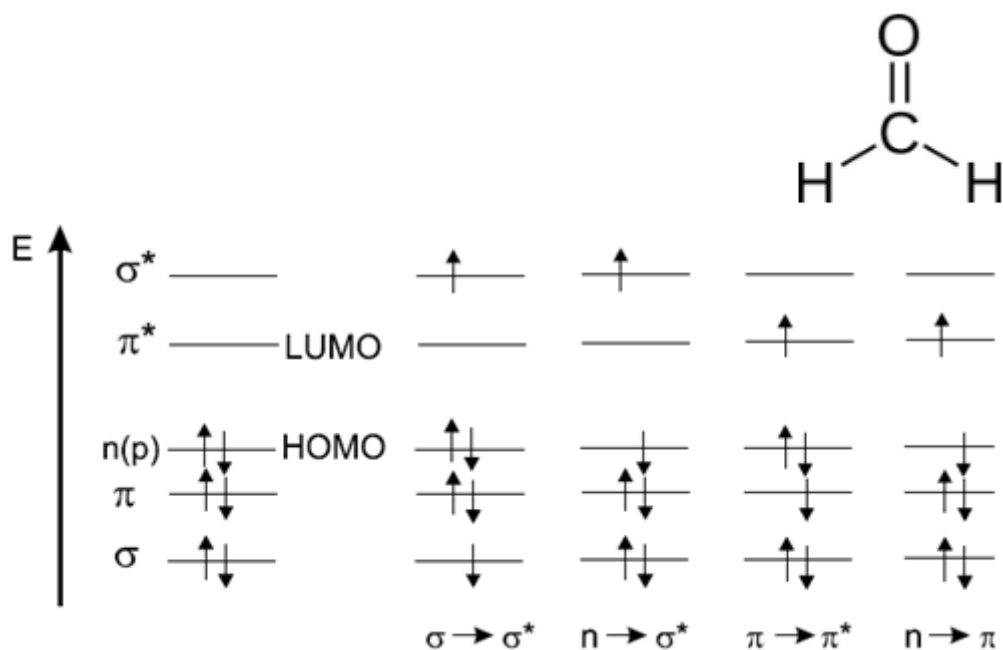
Ono što optičke kemijske senzore čini boljima od drugih vrsta senzora su:

- visoka osjetljivost – vrlo bitno svojstvo ako se analit nalazi u tragovima.
- visoka preciznost – rezultati mogu biti prikazani u visokoj rezoluciji što omogućuje detekciju vrlo malih analita.
- nisu destruktivni – vrlo bitno svojstvo pri ispitivanju bioloških tvari i farmaceutika.
- prilagodljivost – mogućnost korištenja u svim medijima uz prethodnu obradu ako je potrebno [13]

Najčešće metode karakterizacije optičkih kemijskih senzora su UV-vidljiva apsorpcijska i fluorescencijska spektroskopija, o čemu će više riječi biti u idućim poglavljima.

2.1.1.1. Apsorpcija svjetlosti

Do apsorpcije dolazi kada elektromagnetsko zračenje koje odgovara energijama ultraljubičastog (200-400 nm) te vidljivog spektra (400-800 nm) dovedemo u kontakt s apsorbirajućom molekulom. Molekula apsorbira zračenje tih valnih duljina, dolazi do pobuđivanja σ -, π - ili n - elektrona iz osnovnih elektronskih razina u one na višoj energetskej razini. Pojava apsorpcije je slikovito objašnjena na **slici 2.**, na primjeru formaldehida.



Slika 2. Pobuđivanje elektrona prilikom apsorpcije svjetlosti u molekuli formaldehida [14]

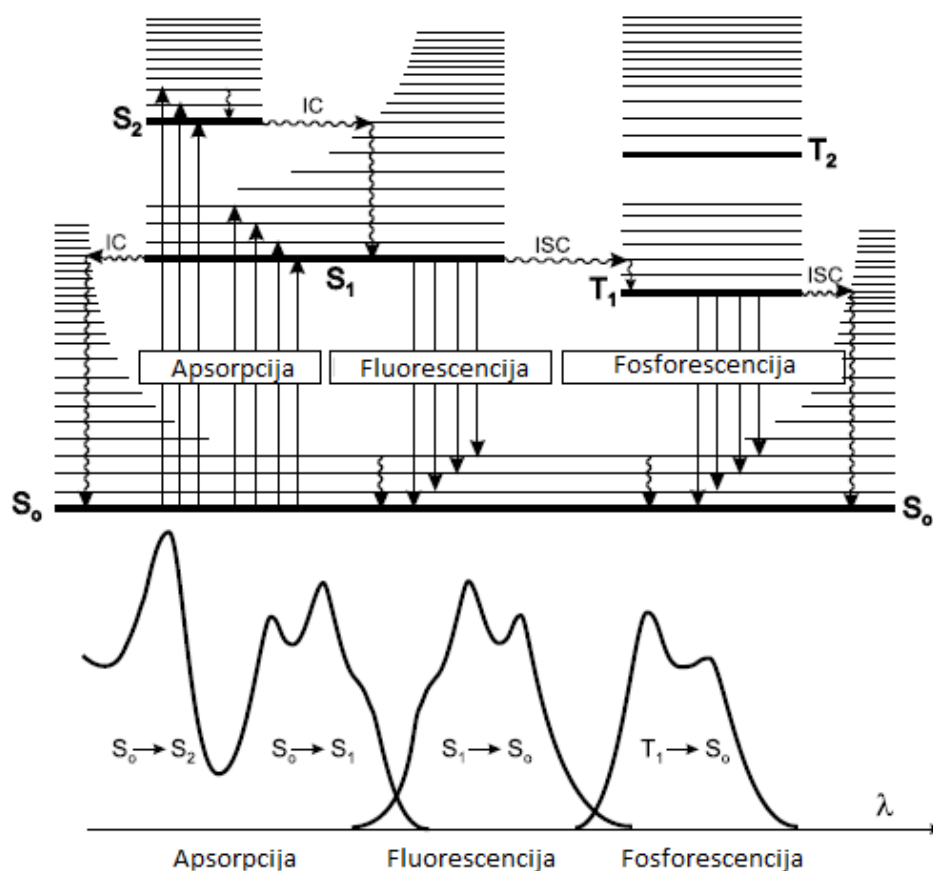
Da bi elektron prešao sa nižeg na viši energetske nivo, on mora primiti točno određenu količinu energije koja odgovara razlici energija između ta dva nivoa. Energetski najlakši prijelaz, koji zahtjeva najnižu količinu energije je iz HOMO orbitale (*engl. Highest Occupied Molecular Orbital*) u LUMO orbitalu (*engl. Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) [14].

Energije ostalih elektronskih prijelaza općenito prate ovaj poredak:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

2.1.1.2. Fluorescencija

Drugi važan pojam vezan za optičke kemijske senzore je fluorescencija. Najlakši način za objasniti fluorescenciju je preko dijagrama Jablonskog, **slika 3**.



Slika 3. Jablonski dijagram [15]

Na dijagramu se mogu uočiti razni prijelazi elektrona na neko od energijskih stanja označenih S_n ili T_n . S_n označava singletna stanja, u kojemu su elektron na osnovnoj razini S_0 i elektron na jednom od pobuđenih singletnih razina S_{n+1} suprotnih spinova. Suprotno tome, elektron u tripletnom stanju je paralelnog spina kao onaj u osnovnom singletnom stanju, S_0 . Na svakom energijskom stanju, elektron se može nalaziti u vibracijskim energijskim stanjima koja su na **slici 3.** prikazana horizontalnim linijama, tako da stanje najmanje energije odgovara najnižoj liniji.

Proces fluorescencije počinje nakon što molekula apsorbira elektromagnetsko zračenje te elektroni i osnovnog nivoa (S_0) prijeđu u neko pobuđeno stanje (S_1 ili S_2). Moguće pojave nakon apsorpcije su interna konverzija (IC), fluorescencija ($S_1 \rightarrow S_0$), međusustavni prijelaz (ISC), fosforescencija ($T_1 \rightarrow S_0$) i odgođena fluorescencija ($T_1 \rightarrow S_1$). [15,16]

Interna konverzija je proces relaksacije, koji rezultira prijelazom na najniže vibracijsko stanje pobuđene razine. Kao posljedica se javlja sniženje energije emitiranog elektrona u odnosu na onaj koji je izazvao pobuđivanje. Ovaj proces traje približno 10^{-12} s.

Fluorescencija je emisija elektrona iz stanja $S_1 \rightarrow S_0$. Nakon apsorpcije, elektron u pobuđenom stanju ostaje svega 10^{-10} do 10^{-7} s. Nakon toga slijedi relaksiranje do osnovnog stanja uz emitiranje energije. Fluorescencija započinje iz najnižeg vibracijskog nivoa u pobuđenom singletnom stanju, a završava u jednom od viših nivoa u osnovnom singletnom stanju. Emitirana energija je uvijek manja od apsorbirane zbog procesa interne konverzije i međusustavnog prijelaza.

Međusustavni prijelaz (engl. *Intersystem crossing*, ISC) je prijelaz između vibracijskih nivoa iste energije iz singletnog pobuđenog stanja (S_1) u neko tripletno stanje T_n . Ukoliko je $n > 1$, elektron se relaksira do najnižeg vibracijskog nivoa u tripletnom stanju T_1 . ISC prijelaz je dovoljno brz ($10^{-7} - 10^{-9}$ s) da se natječe sa procesima fluorescencije i interne konverzije.

Fosforescencija je prijelaz iz tripletnog stanja T_1 u osnovno stanje S_0 . Ovaj proces je zabranjen zbog istih spinova elektrona u T_1 i S_0 te je kao posljedica toga vrlo spor te je konstanta brzine u odnosu na fluorescenciju vrlo mala. Spektar fosforescencije je na većim valnim duljinama od fluorescencijskog. Razlog je energija vibracijskih nivoa u tripletnom stanju koja je manja nego kod onih u singletnom stanju.

Odgodena fluorescencija je praktički obrnuti međusustavni prijelaz. Uglavnom do nje ne dolazi spontano zbog velike razlike između S_1 i T_1 stanja, nego je termički potpomognuto. Emisija iz S_1 stanja će biti iste energije kao ona iz normalne fluorescencije, ali uz određeni vremenski pomak [15].

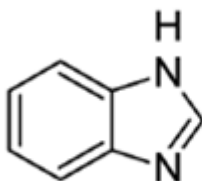
2.2. Heteroaromatski kromofori

2.2.1. Benzimidazolni kromoforski sustavi

Svojstvo molekulskih senzora da apsorbiraju i emitiraju svjetlost dolazi od njihovih strukturnih dijelova koje nazivamo kromofornim jedinicama [17]. Za senzorsku primjenu su važni heteroaromatski kromofori koji se sastoje od elektron-donora, elektron-akceptora te

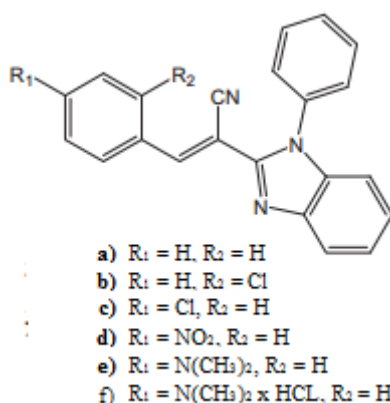
poveznice između njih, zajedno tvoreći jednu cjelinu. Prirode donorskog i akceptorskog dijela, udaljenost među njima te svojstva poveznice određuju optoelektronička svojstva sustava [18].

Zbog svog snažnog elektron-donorskog utjecaja ističu se derivati benzimidazola. To su spojevi koji imaju vrlo važnu strukturnu ulogu u radu mnogih bitnih bioloških molekula. Mnogi derivati benzimidazola pokazuju antibakterijsko, antitumorsko, antifungalno ili antiviralno djelovanje. Također, zbog sličnosti sa molekulom purina, benzimidazolni derivati mogu vrlo lako djelovati sa biomolekulama u živućim sistemima [19]. Struktura benzimidazola je prikazana na **slici 4**.



Slika 4. Struktura benzimidazola

Primjeri heteroaromatskih kromofora temeljenih na benzimidazolu su dani na **slici 5**.



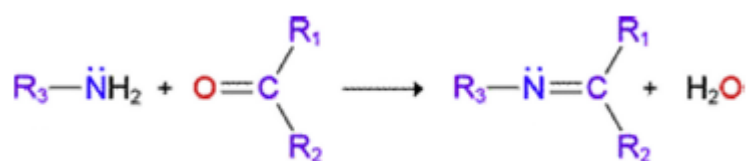
Slika 5. Derivati benzimidazola koje su sintetizirali M. Hranjec i sutadnici [19]

Razlozi zbog kojih se benzimidazolni derivati istražuju u senzorskoj primjeni su:

- elektron-donorski karakter
- prošireni π -konjugirani sustav
- planarnost molekule

- efektivni i selektivni za detekciju kationa i aniona
- laka i ekonomična sinteza
- visoki intenzitet fluorescencije [19]

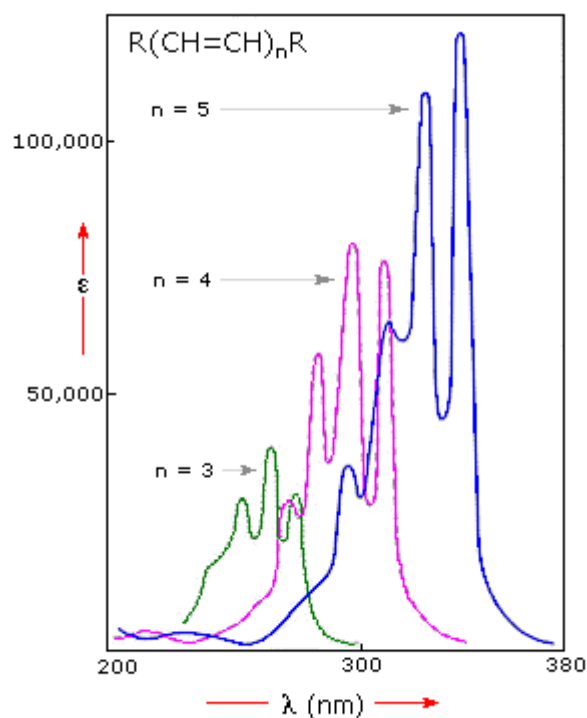
Važno je spomenuti da i mogućnost sinteze Schiffove baze iz amino derivata benzimidazola. Kako su Schiffove baze vrlo dobri ligandi u organometalnim kompleksima, njihovim implementiranjem u π -konjugirani sustav, poboljšava se aktivnost molekule pri detekciji metalnih kationa [20].



Slika 6. Shematski prikaz sinteze Schiffove baze reakcijom primarnog amina sa aldehidom ili ketonom [21]

2.2.2. π konjugirani sustavi

Konjugirani sustav je sustav koji sadrži naizmjenične jednostruke i dvostruke veze, a nastaje preklapanjem p-orbitala. Ovisno o funkcionalnim grupama koje se povezuju, π konjugirani sustavi mogu biti ciklički, aciklički, linearni ili mješoviti. Konjugacijom, molekula smanjuje ukupnu energiju sustava te na taj način povećava stabilnost. Elektroni u π konjugiranom sustavu postaju delokalizirani te ne pripadaju određenom atomu već cijeloj molekuli. Konjugirani sustavi su osnovni dijelovi kromofora, tj. dijelova molekule koji imaju sposobnost apsorbaranja svjetlosti [22]. Na **slici 7.** je prikazan utjecaj proširenja konjugacije

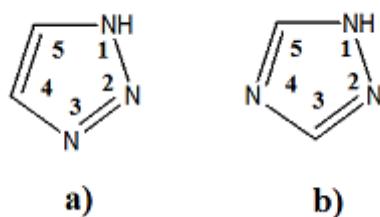


Slika 7. Batokromni pomak te povećanje intenziteta apsorpcije prilikom povećanja konjugacije [23]

Iz slike je vidljivo da dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama (batokromni pomak) te porasta intenziteta apsorpcije. Posljedica ovakvog pomaka je mogućnost pobuđivanja delokaliziranih π -elektrona sa svjetlošću manje energije uz istovremeno poboljšanje spektrofotometrijskih svojstava [24].

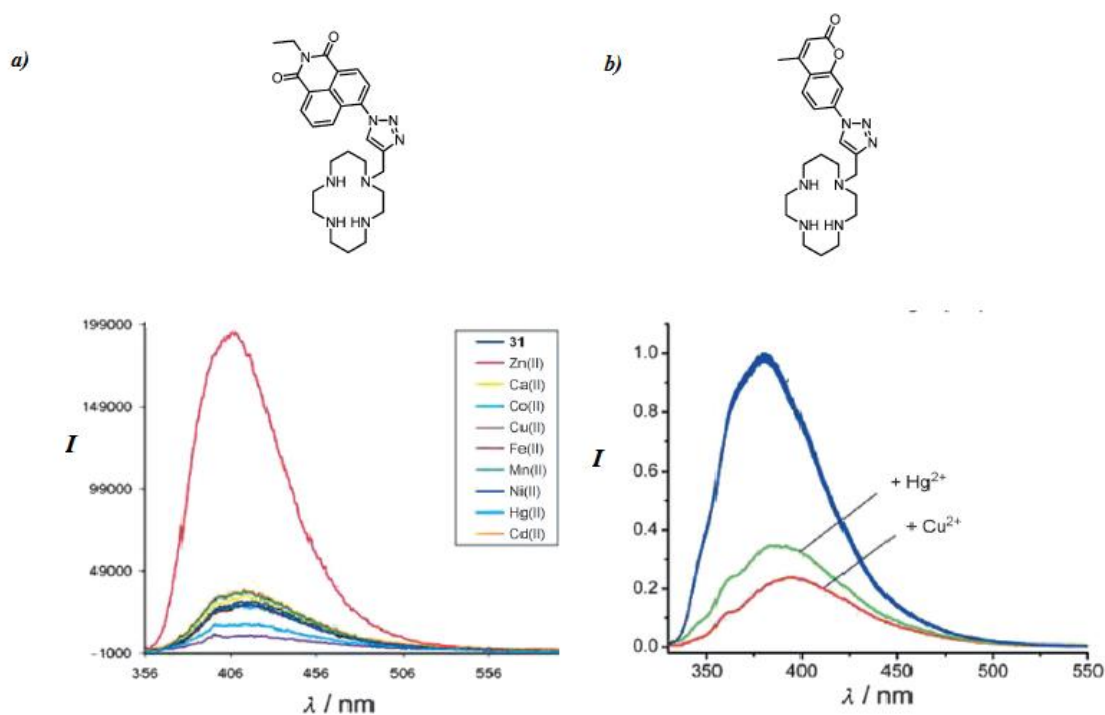
2.2.3. Triazoli

Triazoli su heterocikličke aromatske molekule s općom formulom $C_2H_3N_3$ koji se javljaju u dva izomerna oblika; 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol, kako je prikazano na **slici 8**. Sadrže dva atoma ugljika i tri atoma dušika u peteročlanom prstenu koji mogu poslužiti kao ligand za koordinaciju metala, a također mogu stvarati vodikove veze (zbog kojih imaju svojstvo adicije) [25]. Također, triazoli se odlikuju visokom kemijskom stabilnošću, jakim dipolnim momentom te heteroaromatskim utjecajem koji omogućuje interakcije sa biološkim molekulama te površinama organskih i anorganskih materijala [26].



Slika 8. a) 1,2,3-triazol i b) 1,2,4-triazol

Primjeri senzora temeljenih na 1,2,3-triazolnom prstenu su prikazana na slici **9**. Oba senzora su konstruirana tako da imaju dobru topljivost u vodi te da imaju mogućnost kompleksiranja sa metalnim ionima. Molekula **a)** prikazuje molekulu u kojoj triazolni prsten povezuje ciklamski prsten sa naftalimidnom skupinom. Spektrofotometrijskom karakterizacijom je pokazano da molekula **a)** pokazuje porast intenziteta fluorescencije kada se kompleksira sa Zn^{2+} ionom. Također, moguće ju je koristiti *in vivo*. Molekula **b)** je slične strukture kao i **a)** uz razliku da je naftalimidna skupina zamijenjena sa kumarinskom. Kompleksiranje sa Hg^{2+} i Cu^{2+} iona na molekulu **b)** izaziva gašenje fluorescencije [27].



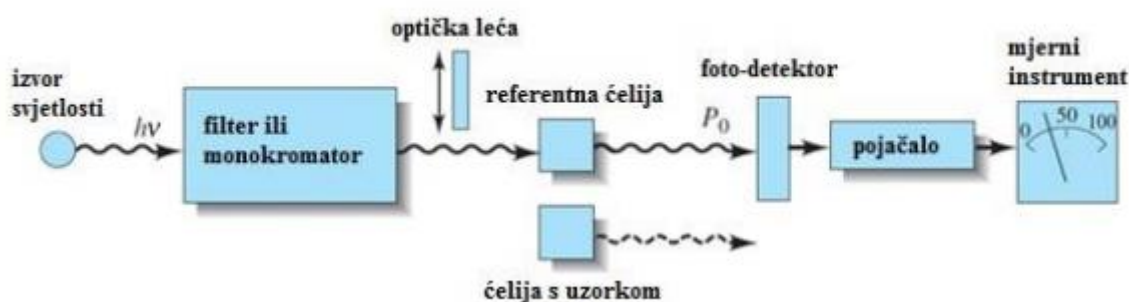
Slika 9. Optički kemijski senzori sa 1,2,3-triazolnim prstenom u svojoj strukturi[27].

2.3 Spektrofotometrijske metode za ispitivanje optičkih kemijskih senzora

Spektroskopske metode se baziraju na interakciji elektromagnetskog zračenja i ispitivanog uzorka. Najčešće korištene su UV-vidljiva apsorpcijska i fluorescencijska spektrofotometrija. Osim navedenih, često se koristi i infracrvena spektrofotometrija koja u cilju identifikacije funkcionalnih grupa molekule koristi elektromagnetsko zračenje viših valnih duljina uzrokujući vibracije i rotacije.

2.3.1. UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija

Spektrofotometar radi na principu da jedan snop zračenja prolazi kroz kivetu u kojoj se nalazi ispitivani uzorak otopljen u transparentnom otapalu, a druga, referentna zraka, prolazi kroz kivetu u kojoj je samo otapalo. Nakon prolaska kroz kivetu, elektroničkim detektorom se mjere intenziteti i međusobno se uspoređuju svjetlosni snopovi [28]. Shema spektrofotometra prikazana je na **Slici 10**.



Slika 10. Shematski prikaz spektrofotometra [28]

Apsorpcija zračenja u određenom uzorku je opisana Lambert-Beerovim zakonom (1)

$$A = \log (I_0 / I) = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija, ε molarni apsorpcijski koeficijent, c koncentracija ispitivanog spoja u mol/L, l duljina ćelije u cm, I_0 intenzitet zrake prije prolaska kroz uzorak te I intenzitet zrake nakon prolaska kroz uzorak.

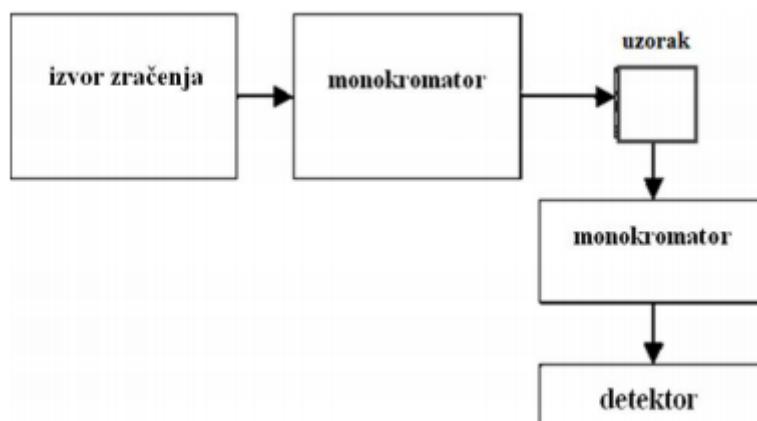
Iz izraza (1) je vidljivo da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji ispitivanog analita u uzorku. To znači da ako ispitivani spoj apsorbira svjetlost, intenzitet prije prolaska kroz kivetu mora biti veći nego nakon prolaska [29].

2.3.2. *Fluorescencijska spektrofotometrija*

U odnosu na UV/Vis apsorpcijsku spektroskopiju, fluorescencijska se odlikuje većom selektivnosti, osjetljivosti i većim brojem mjernih tehnika. Instrument koji se koristi za analizu fluorescencijskom spektroskopijom je fluorimetar, a sastoji se od izvora elektromagnetskog zračenja, kivete u kojoj se nalazi ispitivani uzorak, monokromatora te detektora. Monokromator se koristi kako bi se selektirale valne duljine koje propušta uzorak.

Nakon pobude zračenje fluorescencije emitira se u svim smjerovima, stoga je potreban monokromator koji vrši selekciju valnih duljina koje propušta kroz uzorak, a detektor prikuplja informacije o emisiji [30].

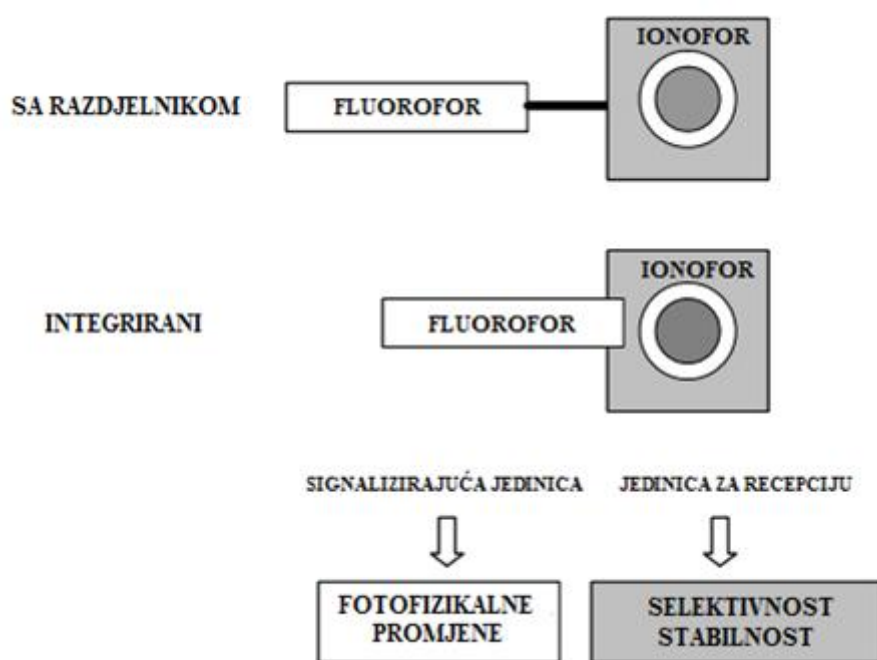
Shema rada fluorimetra je prikazana na **slici 11**.



Slika 11. Shema rada fluorimetra [31]

2.3.2.1. Fluorescentni senzori

Fluorescentni senzori su molekularni uređaji koji detektiraju prisutnost ciljanog spoja fluorescencijom. Sastavni dijelovi su mu fluorofor i ionofor. Fluorofor je dio molekule odgovoran za pretvaranje signala u mjerljivi signal, a uloga ionofora je selektivno vezanje analita [32]. Na **slici 12.** je prikazana shema fluorescentnog senzora.



Slika 12. Shematski prikaz različitih izvedbi fluorescentnih molekularnih senzora [33]

Na **slici 12.** su prikazane dvije osnovne izvedbe fluorescentnog senzora. U prvom su fluorofor i ionofor odijeljeni razdjelnikom, a u drugom slučaju su integrirani. Zajedničko i jednima i drugima je da kada se analit veže na ionofor, fotofizička svojstva fluorofora se mijenjaju (intenzitet fluorescencije, valna duljina emisije, vrijeme trajanja fluorescencije) [33].

2.3.2.2. Mehanizmi prijenosa i stvaranja signala

Kako bi došlo do promjene spektrofotometrijskih svojstava senzora, on mora mijenjati svoja fotofizička svojstva u interakciji s analitom te na taj način stvoriti signal.

Mehanizmi koji omogućuju stvaranje i prijenos signala fluorescentnih senzorskih molekula su intramolekulski prijenos naboja (*engl. Intramolecular Charge Transfer, ICT*), fotoinducirani prijenos elektrona (*engl. Photoinduced Electron Transfer, PET*) i rezonantni prijenos energije (*engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*).

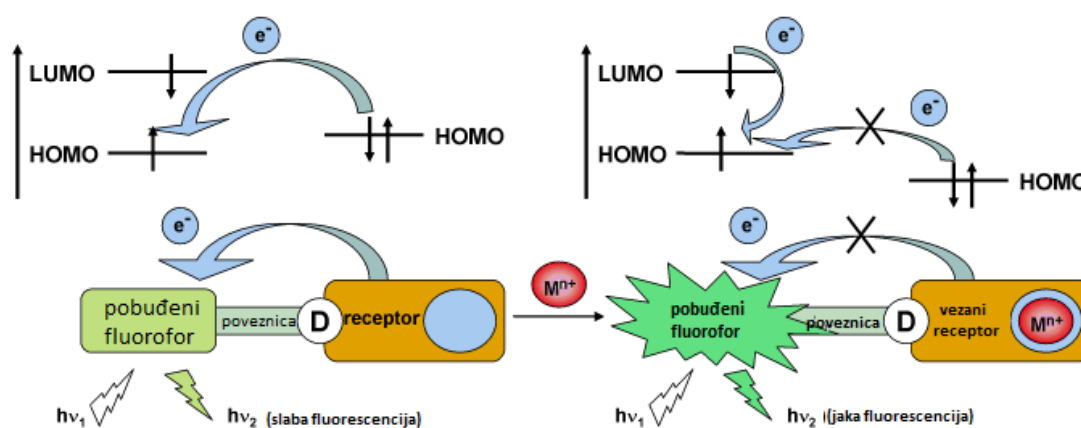
U ICT mehanizmu se prijenos energije može događati unutar istog elektronskog sustava, ali također i između dva sustava sa visokom razinom elektronske konjugacije. Ovakav prijenos elektrona se događa u *push-pull* sustavima. Na jednom kraju molekule je elektron donorska grupa („*push*“), a na drugom je elektron akceptorska („*pull*“) tako da je molekula polarizirana. U pobuđenom stanju se polarizacija povećava, novonastali dipolni moment reagira sa dipolima iz medija te proces rezultira velikim Stokesovim pomacima [34].



Slika 13. ICT mehanizam prijenosa naboja [34]

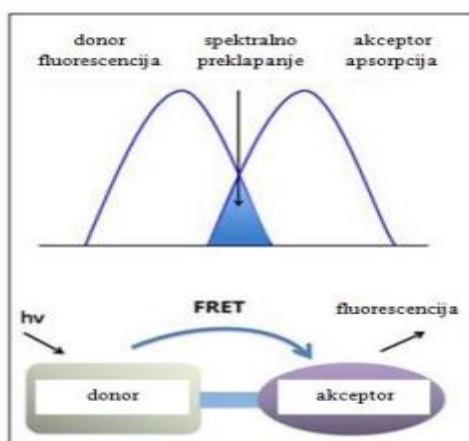
U procesu fotoinduciranog prijenosa molekularni sustav se sastoji od fluorofora povezanog na donorski atom. Prilikom pobude fluorofora, elektron se prenosi iz donorske HOMO orbitale u LUMO orbitalu fluorofora, te na taj način smanjuje fluorescenciju fluorofora. Kada se metalni kation veže na receptorsko mjesto, redox potencijal donora raste a njegova HOMO orbitala postaje niže energije nego ona kod fluorofora. Na taj način se onemogućava

prijenos elektrona na fluorofor te nema gašenja fluorescencije. Drugim riječima, prilikom vezanja metalnog iona na elektron-donorski atom, raste intenzitet fluorescencije [35,36]. Grafički prikaz dan je na **slici 14**.



Slika 14. PET mehanizam [36]

Rezonantni prijenos energije je fizikalni proces u kojemu dvije molekule sličnih energijskih stanja mogu izmjenjivati njihovu energiju zbog dipol-dipolne interakcije. Jedna molekula (donor), apsorbira energiju zračenja te ju druga (akceptor) emitira. Uspješnost FRET efekta ovisi ponajviše o udaljenosti između donora i akceptora [37].



Slika 15. FRET mehanizam prijenosa energije [37]

2.4. „Click“ kemija

Pojam „click“ kemije prvi puta je spomenut 2001. godine od strane K. B. Sharplessa, a odnosi se na novi pristup kemijskoj sintezi. Glavne karakteristike „click“ reakcija su jednostavnost, efikasnost te selektivnost [39]. Da bi neku reakciju opisali kao „click“ reakciju, ona mora ispunjavati sljedeće uvjete:

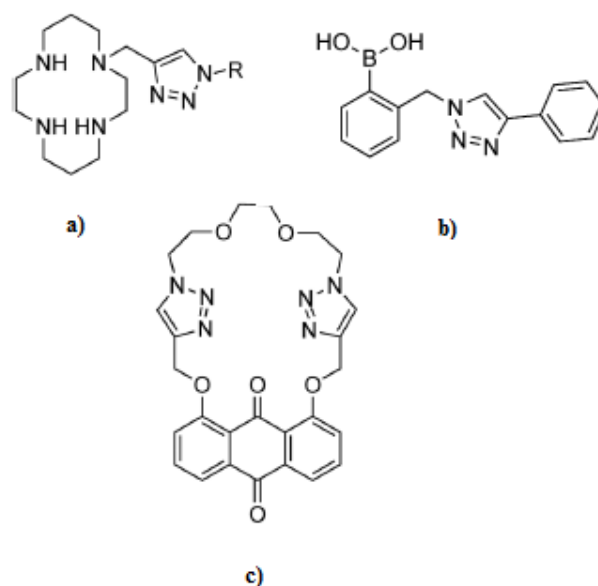
- Jednostavni reakcijski uvjeti
- Modularnost
- Stereospecifičnost
- Visoko iskorišćenje reakcije
- Jednostavna izolacija produkata
- Blagi reakcijski uvjeti (atmosfera tlak i sobna temperatura)
- Minimalne količine otapala koja moraju biti bezopasna i lako uklonjiva
- Dobivanje nusprodukata koji nisu štetni [40]

„Click“ reakcije se mogu podijeliti u 4 glavne skupine:

- 1) Cikloadicija nezasićenih vrsta – 1,3-dipolarna cikloadicija i Diels-Aldersove transformacije
- 2) Nukleofilna supstitucija – reakcije otvaranja heterocikličkih prstenova (kod epoksida, azimidina itd.)
- 3) Nealdolni tipovi karbonilnih reakcija
- 4) Adicije na nezasićene C-C veze [41]

„Click“ reakcije su se pokazale kao moćan alat u konstruiranju π -konjugiranih sustava za senzorsku primjenu. Posebice se to pokazuje u implementacije 1,3-triazola kao poveznice između fluorofora i receptora omogućujući efektivan PET sistem između relativno udaljenih dijelova molekule [42].

Primjer kemijskog senzora sintetiziran „click“ putem je prikazan na **slici 16**.



Slika 16. Primjeri senzora dobivenih "click" reakcijom. **a)** Zn^{2+} senzor **b)** Hg^{2+} senzor **c)** Al^{3+} senzor [43]

Sva tri senzora prikazana na **slici 16.** su dobivena „click“ reakcijom.

Senzor **a)** je makrociklički senzor koji pokazuje visoku selektivnost na Zn^{2+} kation. Također, pokazalo se da ga se može primjenjivati *in vivo*, na stanicama sisavaca.

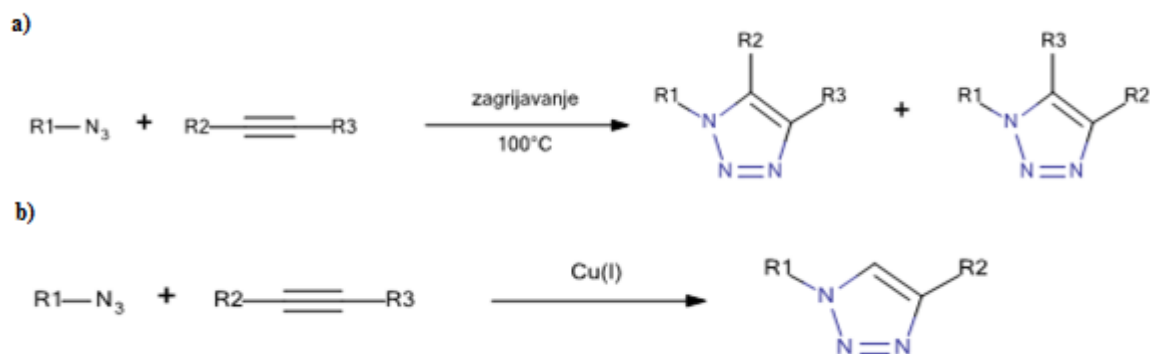
Senzor **b)** u sebi sadrži triazolni prsten, ali on ne sudjeluje u interakciji sa analitom, već je samo dio konjugiranog sustava.

Senzor **c)** sadrži 2 triazolna prstena pri čemu oba sudjeluju u vezanju analita [42].

2.4.1. *Cu (I) katalizirana 1,3-dipolarna Huisgenova cikloadicija (CuAAC)*

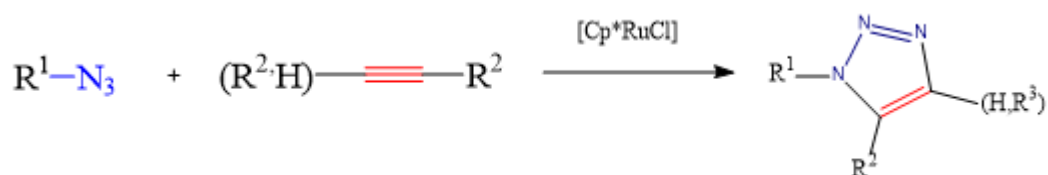
Koristeći klasičnu 1,3-dipolarnu Huisgenovu cikloadiciju, kao smjesa se dobije smjesa 1,4- i 1,5-supstituiranih 1,2,3 triazola. Reakcija se odvijala sporo, pod povišenom temperaturom te je izdvajanje željenog produkta bilo kompliciranije.

Koristeći bakar kao katalizator, Sharpless je ubrzao klasičnu 1,3-dipolarnu Huisgenovu reakciju 10^7 puta. Uz to, kataliziranu reakciju je moguće provesti u širem rasponu uvjeta (sobna temperatura, različita otapala, pH vrijednosti u rasponu od 5 do 12) te se kao produkt dobivao jedino 1,4-supstituirani 1,2,3 triazol koji se jednostavnom filtracijom mogao izolirati iz smjese. Ovakva reakcija zadovoljava sve uvjete da se naziva „click“ reakcijom [43,44].



Slika 17. A) Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija i B) azid-alkin cikloadicija katalizirana Cu(I) [44]

Zanimljivo je napomenuti da se upotrebom rutenija umjesto bakra kao katalizatora dobiva 1,5-supstituirani 1,2,3 triazol [45]. **Slika 18.**

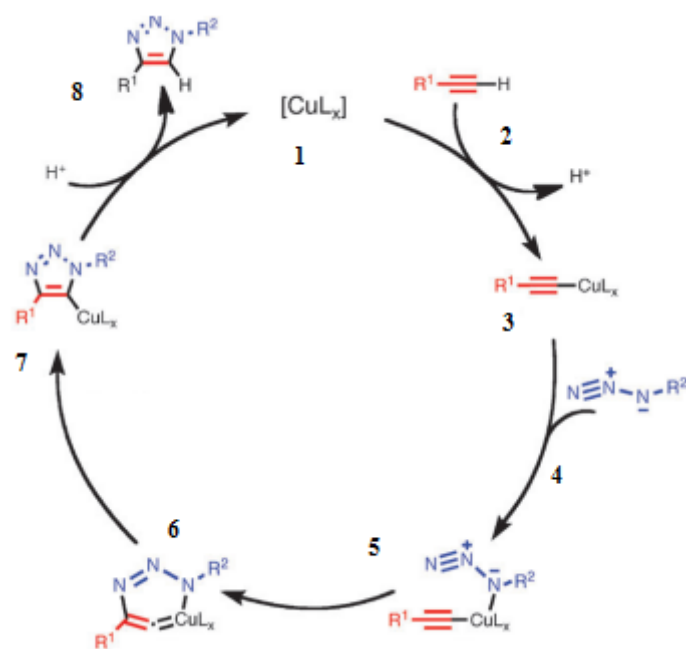


Slika 18. Azid-alkin cikloadicija katalizirana rutenijem[45]

2.4.1.1. *Mehanizam CuAAC reakcije*

Najčešći uvjeti za dobivanje Cu(I) katalizatora su pomoću Cu(II) soli (npr. CuSO₄) uz natrijev askorbat kao redukcijsko sredstvo u smjesi otopina vode i alkohola, ali moguće je koristiti i Cu(I) soli (CuBr, CuOAc) zajedno sa bazom ili Cu(0) (npr. strugotine bakra). U svakom slučaju, potrebno je osigurati maksimalnu količinu Cu(I).

Mehanizam reakcije je prikazan na **slici 19**.



Slika 19. Mehanizam CuAAC reakcije [47]

Nakon što se u reakciji osigurala maksimalna količina Cu(I) katalizatora, u prvom stupnju se veže alkin uz izdvajanje jednog liganda pri čemu nastaje bakrov acetilid **3**. Dalje, azid istiskuje drugi ligand te veže na bakrov kompleks formirajući intermedijer **5**. Napadom krajnjeg dušikovog atoma na C-2 položaj intermedijera nastaje nestabilni ciklički šesteročlani C(III) kompleks **6**. Kako bi se postigla što niža energija sustava i tako povećala stabilnost, on se preuređuje u peteročlani ciklički derivat triazola i bakra **7**. Katalitički ciklus se zatvara izmjenom kompleksa sa vodikom te kao konačni produkt nastaje 1,4-supstituirani 1,2,3-triazol [46,47].

3. Eksperimentalni dio

3.1. Opće napomene

Kemijske reakcije provedene su uobičajenim metodama organske sinteze i modernim metodama “*click*” kemije. Tijek kemijskih reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom, TLC (engl. *Thin Layer Chromatography*). Kao nepokretna faza korištene su pločice 60F-254 prevučene tankim slojem silikagela (Merck), a kao eluens korištena je smjesa otapala diklormetan/metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$) u različitim volumnim omjerima.

Pročišćavanje reakcijskih smjesa kolonskom kromatografijom provedeno je na staklenim kolonama punjenim silikagelom (Fluka, 0,063-0,02 mm) pod utjecajem gravitacijske sile, a kao eluens korištena je smjesa otapala $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ u različitim volumnim omjerima.

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Varian Gemini 300, Bruker AV-600 te Bruker Avance 300. Svi NMR spektri snimani su u $\text{DMSO}-d_6$ kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

3.2. Instrumenti

- pH metar, MA 5740, Iskra d.d.
- UV-Vis spektrofotometar, Carry 100 Scan
- Fluorescencijski spektrofotometar, Carry Eclipse

3.3. Sinteza spojeva

2-[(4-nitro)benz-2-iliden]amino]benzimidazol (spoj **3**)

U okrugloj tikvici otopljeni su 2-aminobenzimidazol **1** (0,5 g; 0,0038 mol) i 4-nitrobenzaldehyd **2** (0,574 g; 0,0038 mol) u 10 mL apsolutnog etanola. Reakcijska smjesa je miješana pri temperaturi refluksa 24 h. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 10:1$. Nakon završetka reakcije, dobiveni talog je pročišćen prekrizalizacijom iz etanola i filtriran preko Büchnerovog lijevka te je izoliran narančasti praškasti produkt **3** (0,3232 g, 0,0012 mol). Iskorištenje reakcije je iznosilo 32,58%.

2-[(4-amino)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj 5)

Sintetski put I:

U tikvici je u 5,4 mL smjese koncentrirane klorovodične kiseline i metanola u omjeru 1:1 otopljen spoj **3** (0,250 g, 0,009 mol). Reakcijska smjesa je miješana na temperature refluksa pola sata te se potom uparila pod sniženim tlakom. Dobiveni praškasti produkt je otopljen u 20mL vode je zaluzen do pH vrijednosti 10 pomoću 10% otopine NaOH. Nastali talog je uparen do suha te zatim prekrystaliziran iz etanola. Željeni produkt nije dobiven.

Sintetski put II:

Početni reagens 4-nitrobenzalhid **2** (0,2491 g; 0,017 mol) je reduciran do 4-aminobenzaldehyda **4** pomoću kositrovog klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,1264 g; 0,0059 mol) prema postupku opisanom u literaturi [48]. Kositrov klorid je otopljen u koncentriranoj klorovodičnoj kiseline pri 0°C (1,5 ml; 1M) te je u takvu otopinu dodana prethodno pripremljena odvaga od 0,2491g spoja **2**. Reakcijska smjesa je zagrijavana do temperature od 60°C pri kojoj je boja otopine postala tamno crvena. Nakon 60 min i hlađenja reakcijske smjese na sobnu temperaturu, smjesa je filtrirana preko Büchnerovog lijevka pri čemu je ostatak na filtru prekrystaliziran iz vode kako bi se izdvojio kositrov klorid. Zaostala reakcijska smjesa je nakon uparavanja do suha, pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 je korišten kao eluens). Izoliran je tamno crveni praškasti produkt 4-aminobenzaldehyd **4** (0,0542 g ; $4,474 \cdot 10^{-4}$ mol). Iskorištenje reakcije je iznosilo 2,65%.

Spoj **4** (0,0542 g; $4,474 \cdot 10^{-4}$ mol) i ekvimolarna količina 2-aminobenzimidazola **1** (0,0596 g; $4,474 \cdot 10^{-4}$ mol) su u okrugloj tikvici otopljeni u 10 ml etanola te je smjesa miješana pri temperaturi refluksa u vremenskom razdoblju od 24 sata. Završetkom reakcije, smjesa je filtrirana preko Büchnerovog lijevka te je dobiven konačni žuti praškasti produkt **5** (0,0708 g; $3,488 \cdot 10^{-4}$ mol). Iskorištenje reakcije je 77,96%.

2-[(4-azido)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj 6)

Spoj **5** je otopljen u 5 ml vode te je dodana p-toluensulfonska kiselina (0,6908 g; $4,027 \cdot 10^{-3}$ mol). Postepeno je dodavan bezvodni natrijev nitrit, NaNO_2 (0,2786 g; $4,027 \cdot 10^{-3}$ mol).

Nakon sat vremena je dodan natrijev azid, NaN_3 (0,0440 g; $6,711 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$). Dobivena je smjesa produkata unutar koje je tankoslojnom kromatografijom i spektrofotometrijskim metodama dokazan spoj **6**. Međutim, spoj **6** nije izoliran zbog malog iskorištenja i poteškoća s pročišćavanjem, već je smjesa dobivenih produkata stavljena u daljnju reakciju.

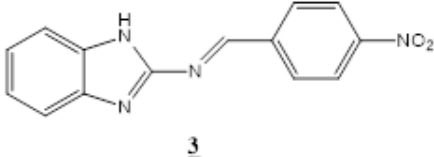

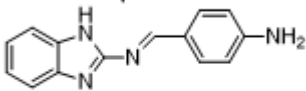
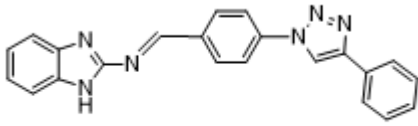
2-{4-[4-(4-aminofenil)-1,2,3-triazol-1-il]benzilidenamino}benzimidazol (spoj 7)

Iz sirove smjese produkata, nastale iz reakcije dobivanja spoja **6**, pokušana je sinteza spoja **7**. U okruglu tikvicu su dodani 4-etinil-anilin (1eq), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5eq) te natrijev askorbat (0,5eq). Reakcijska smjesa je miješana pri sobnoj temperaturi 24h te je po završetku reakcije uparena do suha pod sniženim tlakom. Izolacija spoja **7** je provedena pomoću kolonske kromatografije u sustavu $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 100:1$ no nije bila uspješna zbog premale koncentracije spoja **7** te velikog broja nečistoća.

2-{4-[(4-fenil)-1,2,3-triazol-1-il]benzilidenamino}benzimidazol (spoj 8)

Sirova smjesa produkata iz reakcije dobivanja spoja **6** je stavljena u okruglu tikvicu, te je dodan fenil-acetilen ($49,0 \cdot 10^{-6} \text{ L}$; $4,474 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($223,0 \cdot 10^{-6} \text{ L}$; $2,237 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) te natrijev askorbat (0,0443 g; $2,237 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$). Smjesa je 48 sati miješana na sobnoj temperaturi te je po završetku reakcije, otapalo upareno do suha pomoću rotacijskog uparivača. Spoj **8** je izoliran pomoću kolonske kromatografije. Zbog premale količine produkta nije bilo moguće odrediti točno iskorištenje “click” reakcije.

Tablica 1. Spektroskopska analiza dobivenih spojeva

SPOJ	¹ H NMR (δ, ppm)	¹³ C NMR (δ, ppm)
 <p style="text-align: center;">3</p>	12,88 (s, 1H, NH _{bi}) 9,60 (s, 1H, H _{HC=N}) 8,42 (d, 4H, J=9Hz, H _{arom.}) 8,32 (d, 4H, J=9Hz, H _{arom.}) 7,63 (s, 2H, H _{arom}) 7,49 (s, 2H, H _{arom}) 7,21-7,24 (m, 2H, H _{arom})	
 <p style="text-align: center;">4</p>	9,56 (s, 1H, H _{C=O}) 9,54-9,57 (m, 1H, H _{arom}) 6,63 (d, 1H, J=9Hz, H _{arom}) 6,30 (s, 1H, H _{amino})	190,01, 189,97 187,82, 155,30, 132,52, 123,65, 113,87, 111,80
 <p style="text-align: center;">5</p>	12,34 (s, 1H, NH _{bi}) 9,57 (s, 1H, H _{imino}) 7,55 (d, 1H, J=9Hz, H _{arom}) 7,34-7,37(t, 1H, H _{arom}) 7,20-7,23(t, 1H, H _{arom}) 3,60 (s, 1H, H _{amino})	
 <p style="text-align: center;">8</p>	10,37 (s, 1H, H _{imino}) 9,95 (s, 1H, H _{triazol}) 8,43 (d, 2H, J=9Hz, H _{arom}) 8,17 (d, 2H, J=9Hz, H _{arom}) 9,95 (d, 2H, J=9Hz, H _{arom}) 7,34 (d, 2H, J=9Hz, H _{arom}) 5,76 (s, 1H, H _{bi})	212,21, 210,89, 208,77, 192,84 192, 17, 157,37, 131,91, 131,12, 124,76, 120,25, 44,66, 40,80-40,24 39,13-39,96

3.4. Optička karakterizacija spojeva 3 i 8

Pripravljene spojevi **3** i **8** su spektralno okarakterizirani u ovisnosti o pH, otapalu i prisutnosti metalnih iona. Za spektralnu karakterizaciju su pripravljene sljedeće otopine:

- otopine univerzalnog pufera u području vrijednosti pH od 1,99 do 11,99
- $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ M}$ (pH=1)
- $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ M}$ (pH=13)
- otopine metalnih soli
- matična (*stock*) otopina spojeva **3** i **8**

3.4.1. Optička karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini

Osnovna fotofizička svojstva spojeva **3** i **8** su određena UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u etanolu. Svi spektri su snimani pri koncentraciji $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ koja je dobivena razrjeđivanjem matične otopine spoja.

Matična otopina spoja **3** pripravljena je otapanjem 1,8 mg spoja u 3 mL etanola, a koncentracija pripravljene otopine je $c = 2,256 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Matična otopina spoja **8** je pripravljena otapanjem 1 mg spoja u 3 mL etanola, a njegova koncentracija je iznosila $2,091 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Prije svakog snimanja spektra, snimljena je bazna linija čistog otapala. Alikvot spoja je stavljen u određeno otapalo te su nakon 3 minute snimljeni apsorpcijski i emisijski spektri na valnim duljinama od 200 do 600 nm u kvarcnoj kiveti optičkog puta 10 mm. Za snimanje emisijskih spektara, kao valne duljine pobuda su korišteni maksimumi apsorpcijskih spektara. Slitovi (širina otvora izvorne zrake u fluorimetru) korišteni pri snimanju emisijskih spektara su 10/20.

3.4.2. Utjecaj vrijednosti pH

Ispitivan je utjecaj promjene vrijednosti pH na apsorpcijske i emisijske spektre spojeva **3** i **8**. Pri karakterizaciji spojeva **3** i **8**, korišteni su univerzalni puferi vrijednosti pH od 1 do 13. Otopine univerzalnog pufera u rasponu vrijednosti pH od 1,99 do 11,99 pripravljene su prema standardnom postupku za pripremu pufera miješanjem citratne otopine i određenog volumena 0,1 M otopine klorovodične kiseline. Citratna otopina sastoji se od 100,00 mL 0,33 M citratne kiseline (6,93 g citratne kiseline u 100,00 mL demineralizirane vode), borne kiseline mase 3,54 g, 100,00 mL 0,33 M fosfatne kiseline (98%, 2,30 mL u 100,00 mL) te 343,00 mL 1

M natrijeva hidroksida (20,00g na 0,50 L). Citratna otopina (A) i klorovodična kiselina (B) se miješaju u odmjernoj tikvici prema jednadžbi (2):

$$20,00 \text{ ml A} + x \text{ ml B (u 100,00 ml)} \quad (2)$$

$$x \text{ (B)} = \text{volumen klorovodične kiseline (mL)}$$

Tablica 2. Parametri na kojima su snimani fluorescencijski spektri za različite vrijednosti pH

Vrijednost pH	Slitovi	$\lambda_{\text{pobude}} / \text{nm}$
1,050	5-10	280
1,905	5-10	280
2,985	5-10	280
4,095	5-10	280
5,180	5-10	280
6,186	5-10	280
7,348	5-10	280
8,728	5-10	280
9,348	5-10	280
10,790	5-10	280
11,306	5-10	280
12,029	5-10	280
12,752	5-10	280

3.4.3. Utjecaj metalnih iona

Utjecaj metalnih iona na apsorpcijske i emisijske spektre ispitivan je u kvarcnoj kivetu tako da su prvo snimani spektri spojeva **3** i **8** ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) u etanolnoj otopini (3 mL) bez prisustva metalnih iona, a nakon toga sa njihovim prisustvom. Koncentracija metala u otopini je iznosila $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Alikvot matičnih otopina metalnih soli potreban da se postigne koncentracija od $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ je računat prema jednadžbi (3):

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (3)$$

gdje je $c_1[\text{mol dm}^{-3}]$ poznata koncentracija matične otopine metalne soli, $V_1[\text{dm}^3]$ volume soli koji je potreban dodati etanolnoj otopini, $c_2[\text{mol dm}^{-3}]$ je potrebna koncentracija metalne soli, a $V_2[\text{dm}^3]$ volume etanola u kvarcnoj kivetu.

Popis ispitivanih metalnih soli, koncentracije njihovih matičnih otopina te alikvot potreban da se postigne koncentracija metalnih iona od $2 \cdot 10^{-5}$ M je prikazan u **tablici 3**.

Tablica 3. Popis ispitivanih metalnih soli, koncentracije njihovih matičnih otopina te pipetirani alikvot u etanolnu otopinu

Metalna sol	$c(\text{soli})/\text{mol dm}^3$	$V(\text{aliquota})/\mu\text{L}$	$\lambda_{\text{pobude}}/\text{nm}$
NaCl	$2,22 \cdot 10^{-2}$	2,70	376
ZnCl ₂	$2,57 \cdot 10^{-2}$	2,33	374
KCl	$1,52 \cdot 10^{-2}$	3,50	375
HgCl ₂	$2,16 \cdot 10^{-2}$	2,78	375
AlCl ₃ x 6H ₂ O	$1,19 \cdot 10^{-2}$	5,04	375
CoCl ₂ x 2H ₂ O	$9,50 \cdot 10^{-3}$	6,32	375
AgNO ₃	$1,00 \cdot 10^{-2}$	3,00	376
LiCl	$1,17 \cdot 10^{-1}$	0,51	369

Utjecaj metalnih iona na apsorpcijski i emisijski spektar spoja **8** je proveden sa otopinama soli AlCl₃ · 6H₂O, AgNO₃ i ZnCl₂.

3.4.4. Utjecaj otapala

Ispitivan je utjecaj različitih otapala na optička svojstva spoja **3**. Otapala korištena za karakterizaciju svojstava spoja **3** su: dietil-eter, tetrahidrofuran, etil-acetat, diklormetan, aceton, DMSO, acetonitril, etanol, metanol i voda. Koncentracija spoja **3** je iznosila $2,256 \cdot 10^{-6}$ mol. Snimani su apsorpcijski i emisijski spektri pri valnim duljinama od 200 do 800 nm. U **tablici 4**. su prikazana korištena otapala uz eksperimentalne uvjete za snimanje emisijskih spektara (valna duljine pobude i slitovi).

Tablica 4. Popis otapala i eksperimentalni uvjeti u kojima su snimani spektri spoja **3**

Otapalo	$E_T(30)^a$	$\lambda_{\text{pobude}}/\text{nm}$	Slitovi
Dietil eter	34,5	282	10-20
Tetrahidrofuran	37,4	253	10-20
Etil Acetat	38,1	229	10-10
Diklor metan	40,7	380	10-10
Aceton	42,2	370	10-20
Dimetil sulfoksid	45,1	381	10-10
Acetonitril	45,6	370	10-10
Etanol	51,9	373	10-20
Metanol	55,4	282	10-20
Voda	63,1	281	10-10

^a $E_T(30)$ parametar polarnosti otapala

4. Rezultati i rasprava

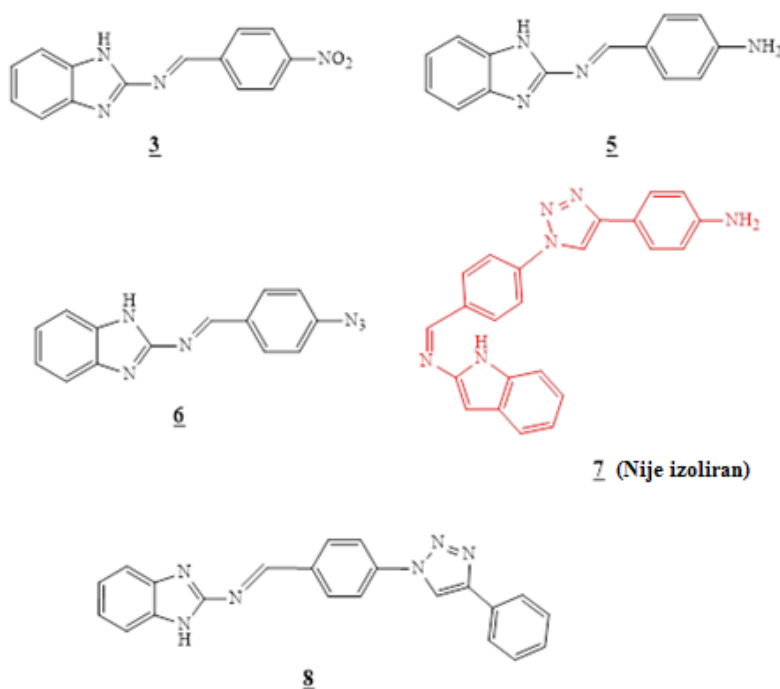
4.1. Sinteza spojeva

U ovom radu su uspješno pripremljeni novi heteroaromatski derivati 2-aminobenzimidazola **1**: 2-[(4-nitro)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **3**), 2-[(4-amino)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **5**), 2-[(4-azido)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **6**) i 2-{4-[(4-fenil)-1,2,3-triazol-1-il]benzilidnamino}benzimidazol (spoj **8**). Spoj 2-{4-[4-(4-aminofenil)-1,2,3-triazol-1-il]benzilidenamino}benzimidazol (spoj **7**) nije uspješno izoliran iz reakcijske smjese.

Spojevi **7** i **8**, su molekule koje u svojoj strukturi sadrže benzimidazolni biciklički prsten povezan sa triazolnim prstenom preko Schiffove baze, tvoreći π -konjugirani sustav. Spojevi ovakvih i sličnih struktura, potencijalno imaju vrlo dobro senzorsko djelovanje zbog mogućnosti koordiniranja metalnih iona i protonabilnih mjesta.

U sintetskom putu je korišten niz klasičnih kemijskih reakcija, te “*click*” reakcije karakteristične za sinteze u modernoj kemiji. Nakon uspješne pripreve spojeva, okarakterizirana su fotofizička svojstva spojeva **3** i **8** metodama UV-vidljive apsorpcijske i fluorescencijske spektrofotometrije. Utvrđen je utjecaj promjene vrijednosti pH, otapala, te utjecaj prisustva različitih metalnih iona.

Prikazi molekulskih struktura spojeva **3** - **8** su prikazani na **slici 20**.

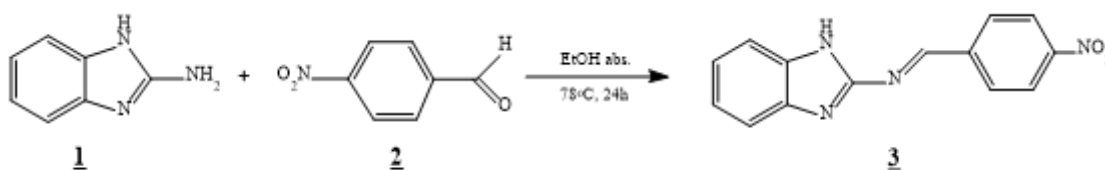


Slika 20. Prikaz molekulskih struktura spojeva **3**, **5**, **6**, **7**, i **8**

4.1.1. Priprava novih derivata benzimidazola 3-8

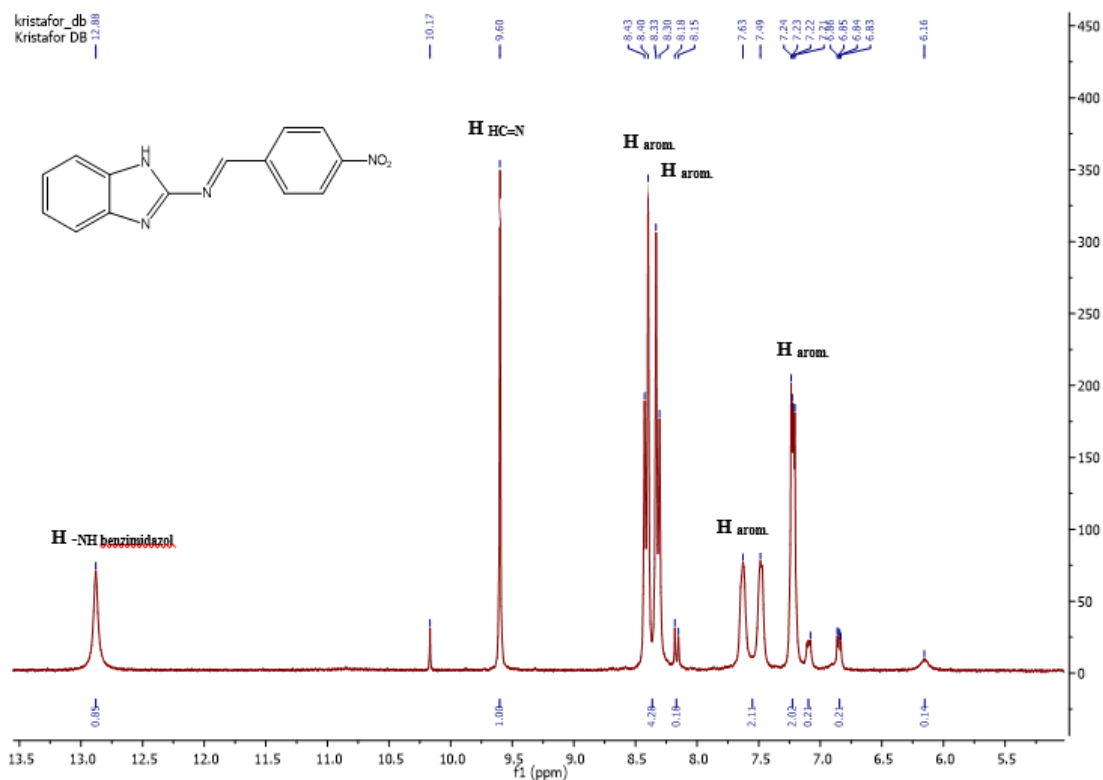
4.1.1.1. Priprava novih derivata benzimidazola 3-5

Spoj **3** pripravljen je reakcijom 2-aminobenzimidazola **1** s 4-nitrobenzaldehydom **2** reakcijom nukleofilne adicije na karbonilnu grupu. U ovom slučaju, spoj **1** djeluje kao nukleofil u prvom koraku reakcije napada karbonilni ugljikov atom na spoju **2** tvoreći hidratizirani karbinolaminski međuprodukt. Etanol, u kojemu se odvija reakcija, zbog alkoholnog karaktera karbinolaminskog međuprodukta djeluje kao slaba kiselina te katalizira dehidrataciju. Gubitkom molekule vode, karbonilni ugljik i dušik se povezuju dvostrukom vezom tvoreći spoj **3**. Ova reakcija je tipična reakcija stvaranja imino funkcionalne grupe, poznatije kao Schiffova baza. Reakcija je prikazana na **Shemi 1**.



Shema 1.

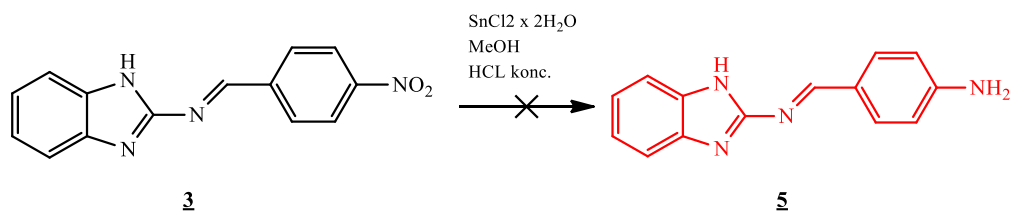
Struktura spoja **3** je potvrđena ^1H NMR spektroskopijom (**Slika 21.**).



Slika 21 ^1H -NMR spektar spoja **3**

U ^1H -NMR spektru se može uočiti karakteristični signal protona benzimidazolne jezgre na 12,88 ppm, te proton koji pripada imino skupini na 9,60 ppm. Na 8,42 i 8,32 ppm su signali koji odgovaraju aromatskim protonima, a na 7,63 i 7,49 ppm su singleti također aromatskih protona. U području od 7,21 do 7,24 ppm su multipleti aromatskih protona.

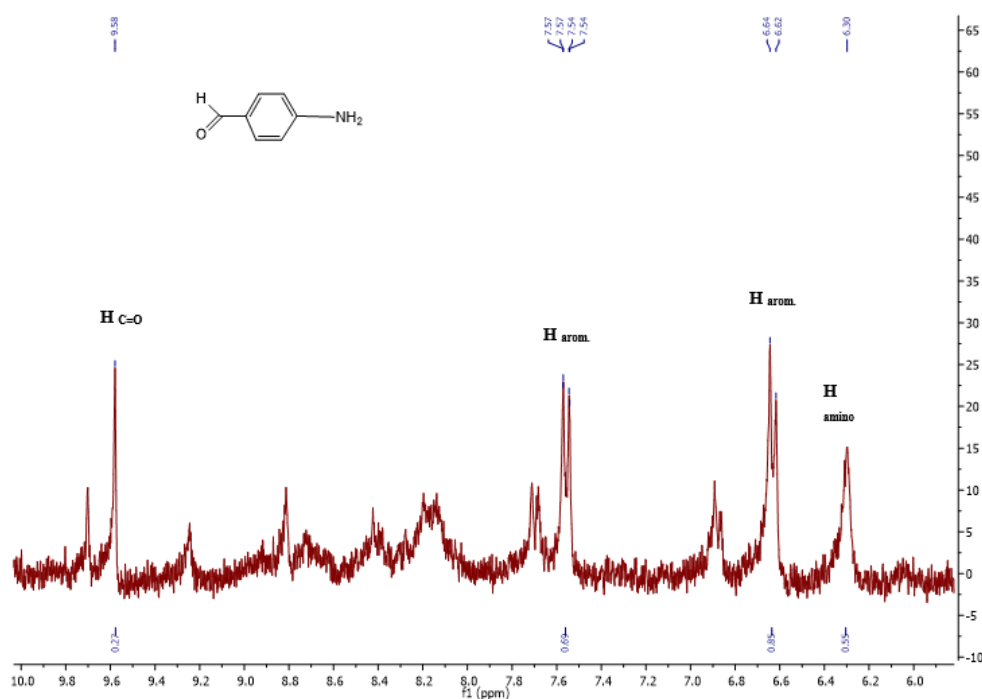
Priprava spoja **5** se prvotno pokušana reakcijom redukcije nitro skupine spoja **3** (Shema 2.). U ovoj reakciji je kositrov klorid poslužio kao elektron donor, dok se kao donor protona koristila kombinacija metanola i klorovodične kiseline.



Shema 2.

Redukcija nitro skupine spoja **3** pomoću kositrovog klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, u kiselom mediju nije bila uspješna. Sintetski put je promijenjen prema **shemi 3**.

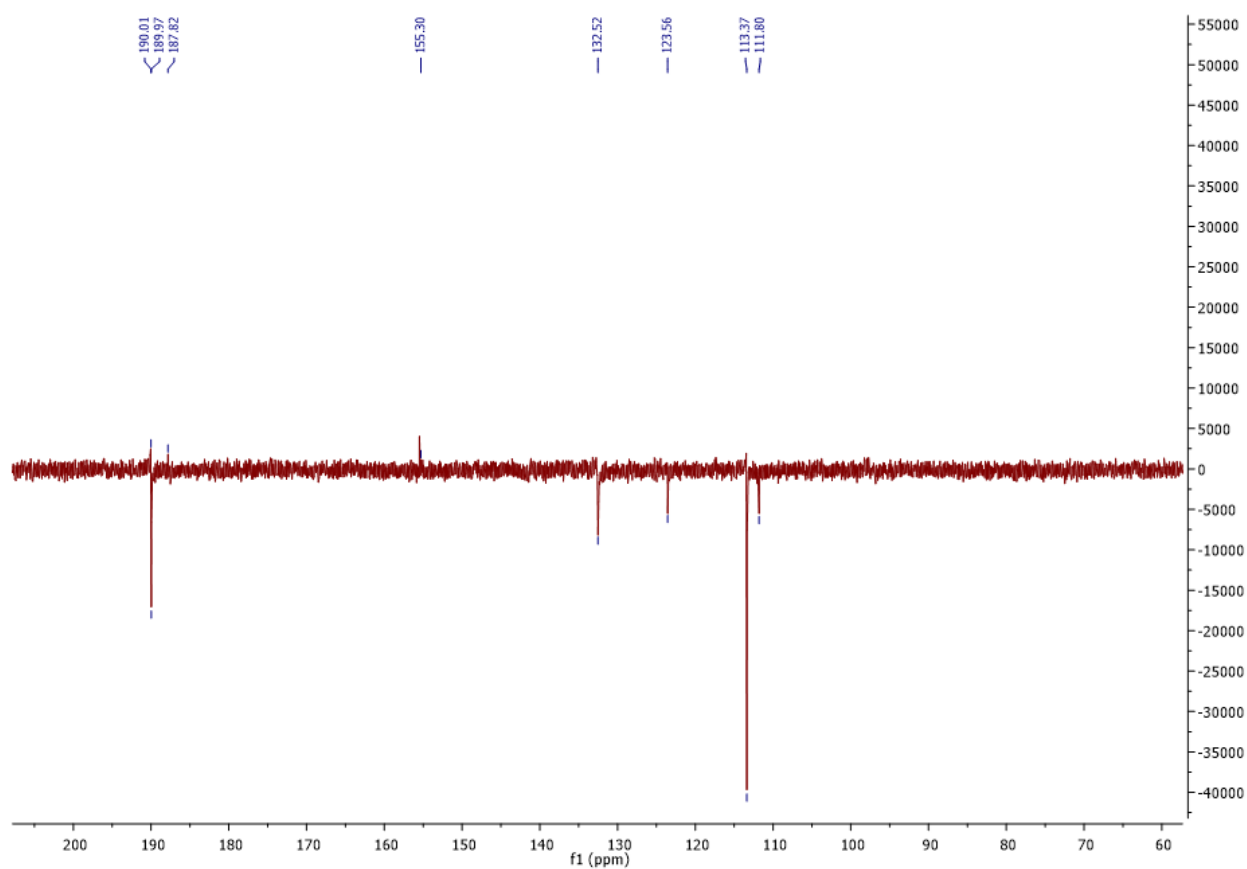
4-aminobenzaldehid (spoj **4**) pripravljen je iz 4-nitrobenzaldehyda **2**. Princip je ostao istakao u reakciji redukcije spoja **3** do spoja **5**. Prvi korak je redukcija nitro do nitrozo skupine, u kojoj je na dušikov atom vezan samo jedan atom kisika. Zatim slijedi adicija dva atoma vodika do stvaranja hidroksilamina. U zadnjem koraku eliminira molekula vode, te ostaje spoj **4**. Dobiven je crveni praškasti produkt te je struktura spoja **4** potvrđena ^1H -NMR i UV-vidljivom apsorpcijskom spektroskopijom (**Slika 22**.)



Slika 22 ^1H -NMR spektar spoja **4**

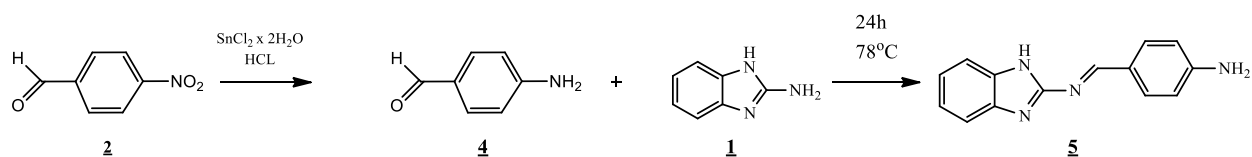
^1H -NMR spektar spoja **4** prikazuje signale karakteristične za protone karbonilne grupe na 9,56 ppm. Multiplieti (9,54-9,57 ppm), dublet (6,63 ppm) te singlet (6,30 ppm) odgovaraju aromatskim protonima.

^{13}C NMR spektroskopijom je potvrđena struktura spoja **4**. **Slika 23**.



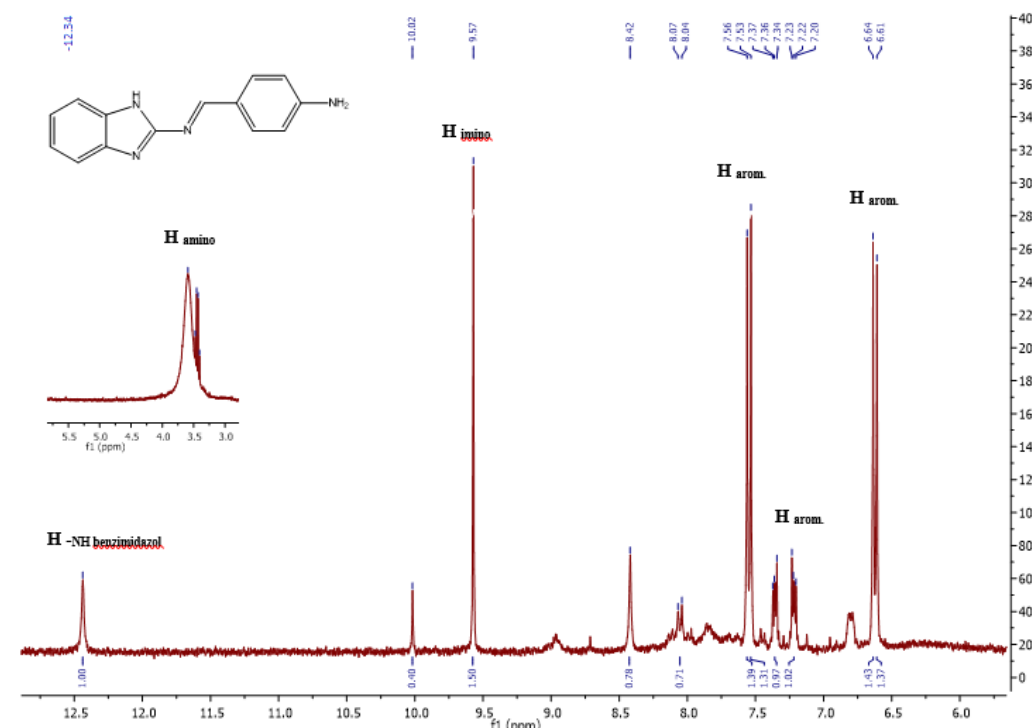
Slika 23. ^{13}C -NMR spektar spoja **4**

Spoj **5** je uspješno pripravljen reakcijom 4-aminobenzaldehida **4** s 2-aminobenzimidazolom **1**. Dobiven je žuti praškasti produkt. Shema 3.



Shema 3.

^1H NMR spektroskopijom je potvrđena struktura spoja **5**. Slika 24.

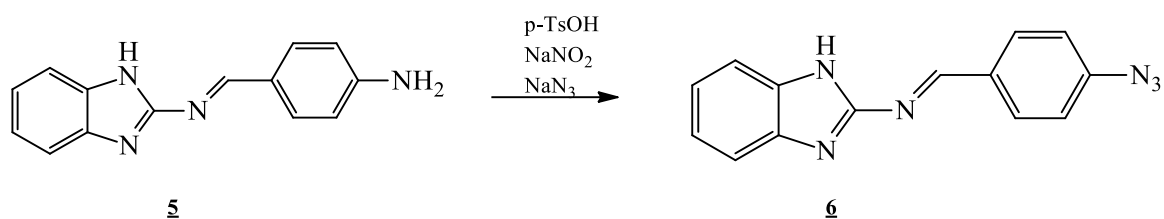


Slika 24. ^1H -NMR spektar spoja **5**

Na ^1H -NMR uočavamo karakteristične singlete za benzimidazolni proton na 12,34 ppm te za imino proton na 9,57 ppm. Na 3,60 ppm je singlet protona iz amino grupe. Ostali signali pripadaju aromatskim protonima, dublet (7,55 ppm) te dva multiplleta u područjima od 7,34-7,37 ppm i 7,20-7,23 ppm.

4.1.1.2..Priprava novih derivata benzimidazola **6-8**

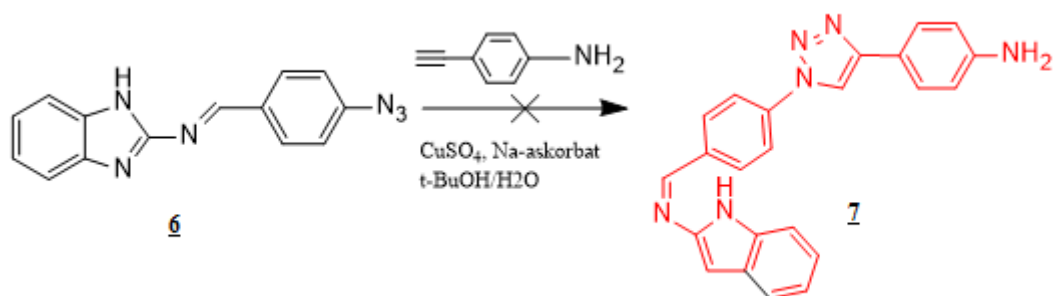
S ciljem dobivanja novih triazolnih derivata benzimidazola, pomoću pripremljenih spojeva **3-5** je planirana daljnja sinteza spojeva **6-8** modernim metodama “click” kemije. Spoj **6** pripremljen je reakcijom spoja **5** u p-toluensulfonskoj kiselini uz dodatak bezvodnog natrijevog nitrita i natrijevog azida (**Shema 4**). Dobivena je smjesa produkata koja se zbog malog iskorištenja nije pročišćavala kolonskom kromatografijom, već je sirova smjesa produkata korištena u daljnjim “click” reakcijama.



Shema 4.

Smjesa koja sadrži **6** je dalje korištena u “click” reakcijama prema mehanizmu Cu(I)katalizirane 1,3-dipolarne Huisgenove cikloadicije. Kao izvor bakra je korištena CuSO₄ sol, a kao redukcijsko sredstvo je upotrebljen natrijev askorbat. Reakcije dobivanja spojeva **7** i **8** se temelje na istim mehanizmima uz razliku je što je u “click” reakciji za dobivanje **7** korišten alkin dietinil-benzen, a za **8** fenilaceten.

Metodama “click” kemije je pokušana priprava **7** prema **shemi 5**. Željeni produkt nije dobiven.

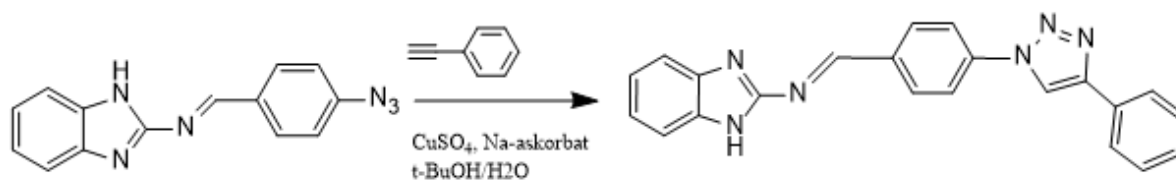


Shema 5.

Spoj **8** je uspješno pripremljen “click” reakcijom **6** i fenilacetilena, **shema 6**.

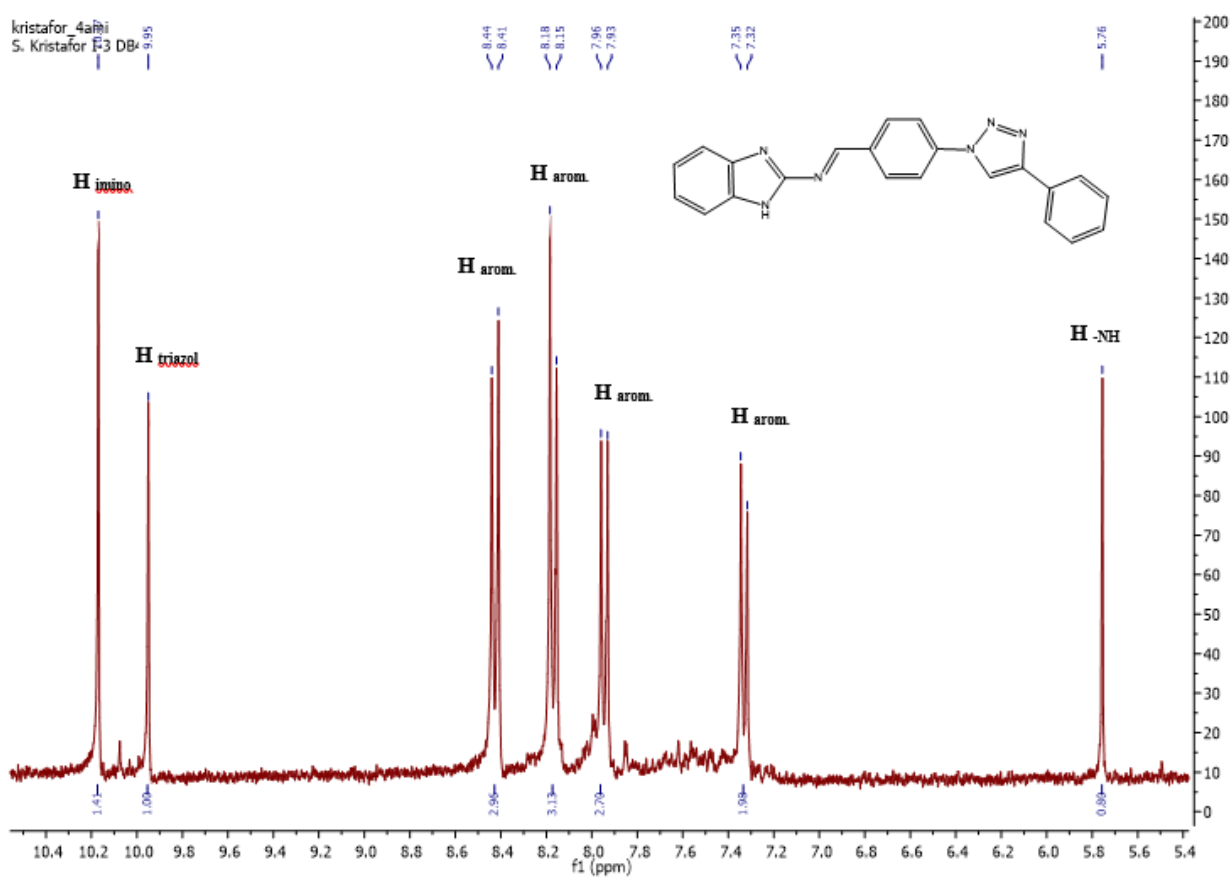
Cu(I) u prvom koraku ulazi u π -interakcije s alkinom te dolazi do deprotoniranja terminalnog vodika na alkinu, formirajući kompleks Cu-acetilid. U drugom stupnju, azidna skupina zbog nukleofilnog karaktera može napasti deprotonirano mjesto na bakrovom kompleksu te se povezati s njim. Reakcija napreduje tako da slobodni elektronski par sa N(1) napada C(5) atom, tvoreći triazolni prsten. Konačnim protoniranjem se oslobađa Cu(I).

Završetkom reakcije, dobiven je „push-pull“ heteroaromatski kromofor, pri čemu je na C(1) položaj triazolnog prstena preko Schiffove baze vezana benzimidazolna skupina, dok je na C(4) vezan benzen.



Shema 6.

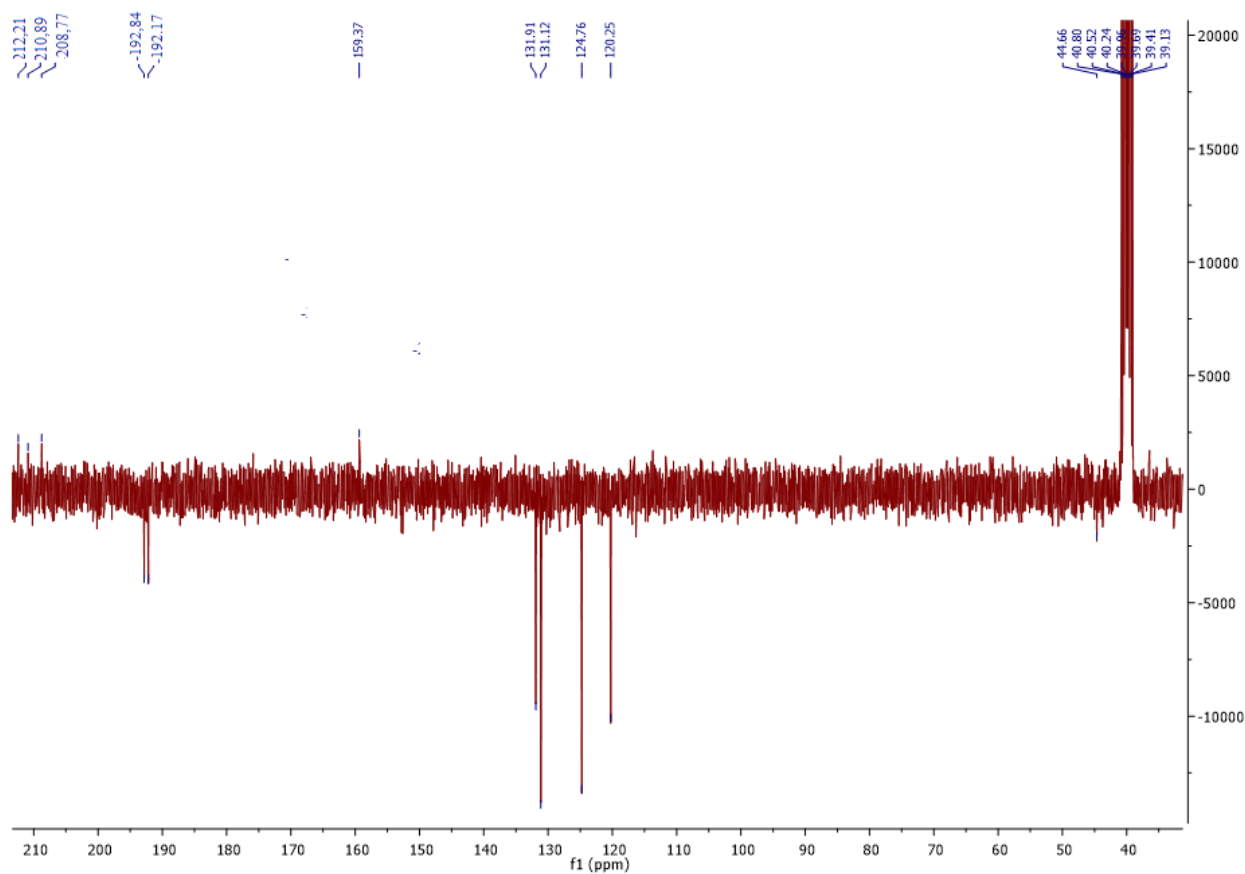
Struktura spoja **8** je potvrđena ^1H -NMR spektroskopijom. **Slika 25.**



Slika 25. ^1H -NMR spektar spoja **8**

^1H -NMR spektar spoja **8** prikazuje karakteristične singlete imino protona (10,37 ppm) te triazolnog protona (9,95 ppm). U području 8,43-7,34 se nalaze dubleti aromatskih protona. Na 5,76 ppm je singlet protona iz benzimidazolnog prstena.

^{13}C NMR spektroskopijom je potvrđena struktura spoja **8**. **Slika 26.**



Slika 26. ^{13}C -NMR spektar spoja **8**

4.2. Spektralna karakterizacija spojeva 3 i 8 u otopini

Spojevi **3** i **8** su konjugirani heteroaromatski kromofori, koji u svojoj strukturi sadrže dušikove atome podložne protonaciji te imaju potencijalna svojstva da se koriste kao optički kemijski senzori. U toj svrsi su ispitivana njihova spektrofotometrijska svojstva ovisno o polarnosti otapala, vrijednostima pH te prisustvu različitih metalnih iona.

4.2.1. Utjecaj otapala

Kada se apsorpcijski ili emisijski spektar određenog spoja mjeri u otapalima različite polarnosti, dolazi do promjena u položaju, intenzitetu i obliku spektra zbog snažnog utjecaja okolnog medija na fotofizička svojstva spojeva. Te promjene nazivamo solvatokromizam (ili fluorosolvatokromizam ako se govori isključivo o promjeni u emisijskom spektru). Rezultat su fizikalnih interakcija između otapala i otopljene tvari koje izazivaju promjene u razlici između osnovnog i pobuđenog elektronskog stanja molekule koja apsorbira energiju.

Obzirom na pomake koji se uočavaju u apsorpcijskom i emisijskom spektru, razlikuju se pozitivni i negativni solvatokromizam. Korištenjem polarnijeg otapala dolazi do negativnog solvatokromizma, a rezultira hipsokromnim pomakom (prema manjim valnim duljinama). Pozitivni solvatokromizam izaziva batokromni pomak (prema većim valnim duljinama) [49].

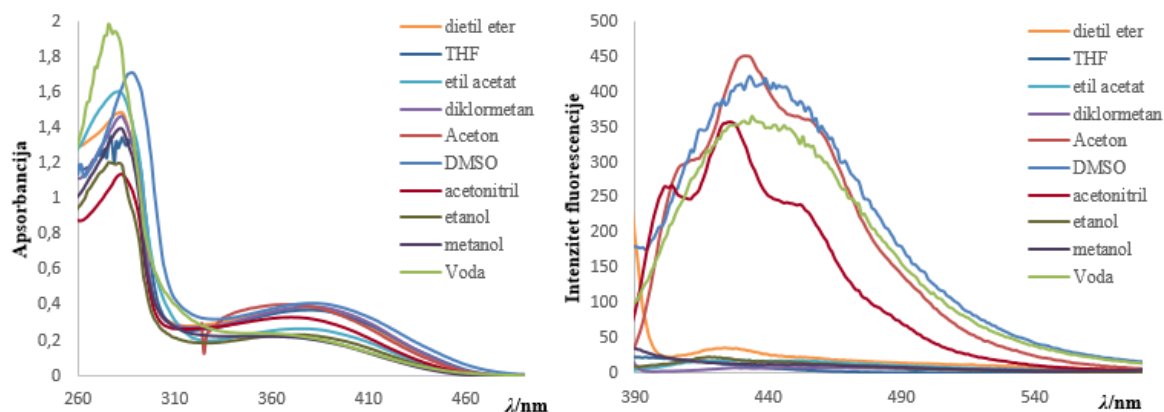
Polarnost otapala je opisana pomoću empirijskog parametra, $E_T(30)$, koji se temelji na negativnom solvatokromizmu piridin N-fenolat betainskog bojila, definira se kao molarna energija prijelaza elektrona iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje. Što je otapalo polarnije, imat će veći $E_T(30)$. Za različita otapala se lako može izračunati iz izraza (4) [50]:

$$E_T(30) \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)} = h \cdot c \cdot \nu \cdot N_A = 28591/\lambda_{\max}, \text{ (nm)} \quad (4)$$

Korištena otapala sa pripadajućim $E_T(30)$ i dobivenim rezultatima su prikazana u **tablici 5**.

Također, u svrsi određivanja senzorske primjene je bitan parametar i Stokesov pomak kojeg određuje razlika između maksimuma emisije i apsorpcije ispitivanog spoja u određenom otapalu, a izražava se u nm ili cm^{-1} . Za zadovoljavajuću senzorsku primjenu, Stokesov pomak ne smije biti manji od 57 nm.

Na **Slici 27.** su prikazani apsorpcijski i emisijski spektri za spoj **3** u različitim otapalima.



Slika 27. a) apsorpcijski i **b)** emisijski spektri spoja **3** u otapalima različite polarnosti

Na apsorpcijskom spektru se uočavaju maksimumi apsorpcije na dvije valne duljine kod svih otapala. Prvi maksimum se kod svih otapala nalazi u području valnih duljina od 276 nm do 288 nm. Drugi maksimumi se nalaze u području valnih duljina od 370 nm do 380 nm, uz iznimke za vodu i metanol gdje su maksimumi na nešto nižim valnim duljinama. Teoretski, konjugirana molekula poput spoja **3** bi u najpolarnijem otapalu trebala imati maksimum na najnižoj valnoj duljini te kako raste polarnost otapala, tako bi se apsorpcijski maksimumi trebali pojavljivati na sve većim valnim duljinama. U slučaju spoja **3**, u grubo se može primijetiti takav trend. U najpolarnijem otapalu, vodi, maksimum apsorpcije se nalazi na 351 nm. Iduće otapalo po polarnosti je metanol, te spoj **3** u njemu apsorbira svjetlost na 350 nm. Redom do najmanje polarnog otapala, ovisnost položaja apsorpcijskog maksimuma ne prati linearno parameter $E_T(30)$, te se apsorpcijski maksimumi nalaze u području od 373 nm do 382 nm. Spoj **3** u dietil-eteru (najmanji parameter $E_T(30)$) apsorbira svjetlost na 383 nm.

Za snimanje emisijskih spektara je za pobudu elektrona korištena svjetlost koja odgovara maksimumima većih valnih duljina sa apsorpcijskog spektra. Dobra fluorescencija se primjećuje samo u 4 otapala: vodi, acetonitrilu, dimetil sulfoksidu i acetonu. U vodi i dimetil sulfoksidu, maksimum emisije se pojavljuje na 438 nm te im krivulja ima sličan oblik. Razlika u ta dva spektra je manji intenzitet apsorpcije svjetlosti u vodi. Acetonitril i aceton također imaju slične oblike krivulje ali kod acetona dolazi do batokromnog pomaka maksimuma uz porast intenziteta emisije. Maksimum emisije spoja **3** u acetonitrilu nalazi se na 428 nm, a u

acetonu na 451 nm. U ostalim otapalima, intenzitet fluorescencije je prenizak za ikakvu senzorsku primjenu.

Iz Stokesovih pomaka, zaključuje se da se spoj **3** može koristiti u senzorskoj primjeni u vodi, acetonitrilu i acetonu.

U **Tablici 5.** su prikazane valne duljine maksimuma apsorpcije i emisije, vrijednosti apsorpcije i intenziteta fluorescencije te molarni apsorpcijski koeficijenti za spoj **3** u ispitivanim otapalima. Molarni apsorpcijski koeficijent, ϵ , je izračunat preko Lambert-Beerova zakona.

Tablica 5. Spektrofotometrijska svojstva spoja **3** u različitim otapalima

Otapalo	$E_T(30)$	λ_{abs}/nm	A	λ_{emiss}/nm	I	Stokesov pomak/ nm	$\epsilon/mol\cdot dm^{-3}\cdot cm^{-1}$
Dietil eter	34,5	382	0,380	426	36	44	1817
THF	37,4	381	0,374	403	21	21	1789
Etil acetat	38,1	378	0,265	434	18	56	1267
Diklor metan	40,7	382	0,390	-	-	-	1865
Aceton	42,2	370	0,400	433	451	81	1913
Dimetil sulfoksid	45,1	382	0,407	438	451	56	1946
Acetonitril	45,6	372	0,332	428	352	80	1588
Etanol	51,9	373	0,229	417	23	44	1095
Metanol	55,4	357	0,226	426	-	69	1081
Voda	63,1	351	0,245	438	356	87	1172

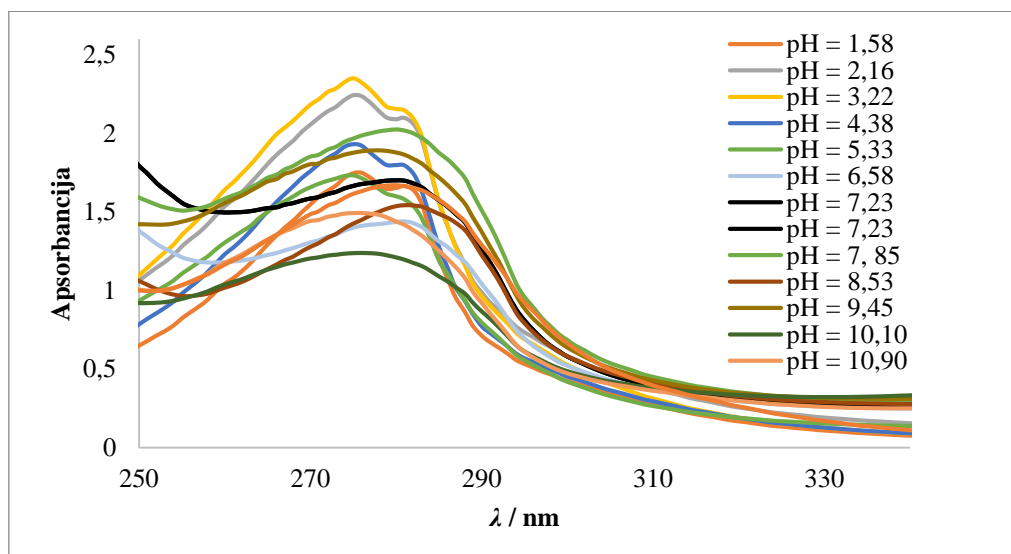
4.2.2. Utjecaj promjene pH vrijednosti

Ispitivana su kiselo-bazna svojstva spojeva **3** i **8** u univerzalnim puferima različitih pH vrijednosti kako bi im se utvrdila mogućnost primjene kao pH senzora.

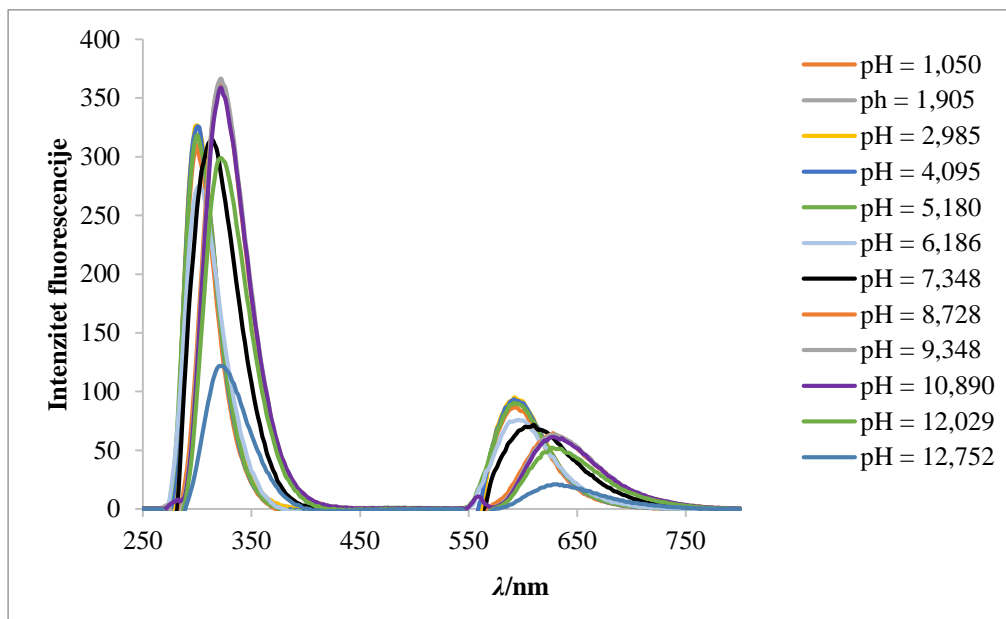
Spoj **3** u svojoj strukturi sadrži elektron odvlačeću nitro skupinu. Kao takva, nitro skupina nema protonabilno mjesto koje bi vezalo H^+ ion, ali promjenom pH vrijednosti u otopini je u nekim slučajevima moguće reducirati nitro skupinu u oblik koji ima svojstvo protoniranja. Ukoliko promjenom pH vrijednosti dođe do redukcije, rezultat će biti promjena na apsorpcijskim i emisijskim spektrima. Međutim, očekivano mjesto protonacije sintetiziranih spojeva jest imino dušik u benzimidazolnoj jezgri.

Na slikama **28.** i **29.** su prikazani apsorpcijski i emisijski spektri spoja **3** u univerzalnim puferima različitih pH vrijednosti. Iz apsorpcijskog spektra se očitavaju maksimumi apsorpcije kod svih pH vrijednosti na 280 nm te je ta valna duljina korištena i kod pobude fluorescencije. Spoj **3** pokazuje još jedan maksimum apsorpcije u pH vrijednostima u području od 1,58 do 5,33 koji se nalazi na 274 nm. Daljnim porastom pH vrijednosti, dolazi do promjene u obliku spektra te se jedini maksimum pojavljuje na 280 nm. Promjena u obliku spektra se pripisuje protoniranju imino dušika na benzimidazolu. Količina apsorbirane svjetlosti ne prati linearno promjene pH vrijednosti.

Svi emisijski spektri su snimani sa pobudom na 280 nm te slitovima 5-10. Emisijski spektri spoja **3** pokazuju dva maksimuma u svim pH vrijednostima. Prvi maksimum, na nižoj valnoj duljini, se očitava na 300 nm kod pH vrijednosti kiselom području. Maksimum emisije spoja **3** u neutralnom području (pH = 7,23) se nalazi na 314 nm. U lužnatom području, maksimumi emisije spoja **3** u svim vrijednostima pH se nalaze na 326 nm. Drugi emisijski maksimumi, se za vrijednosti pH u kiselom području nalaze na 596 nm. Protonacijom spoja se događa pomak maksimuma emisije na 612 nm u neutralnom području, te na 632 nm u lužnatom području.

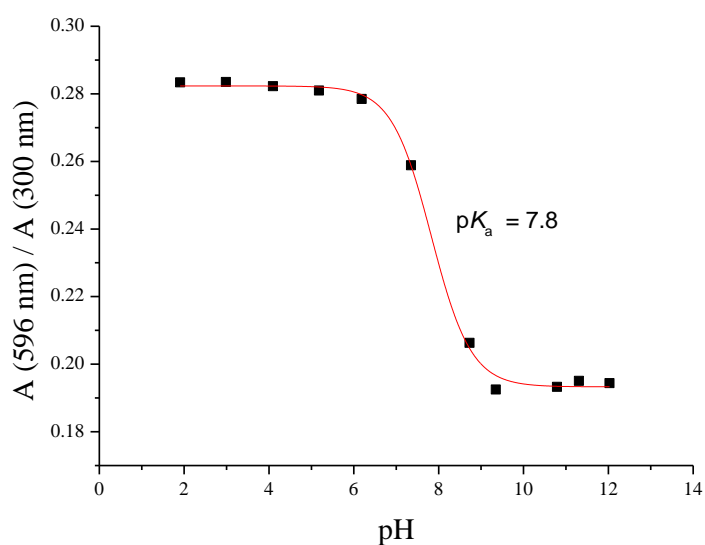


Slika 28. Apsorpcijski spektri spoja **3** u univerzalnim puferima različitih pH vrijednosti



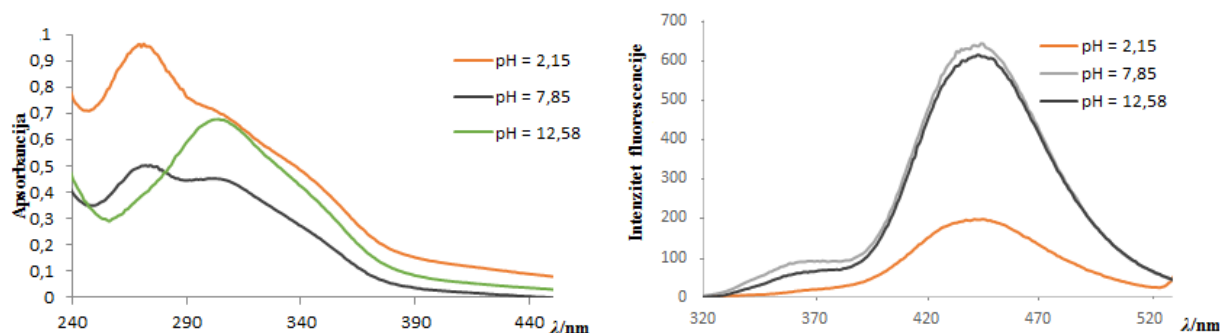
Slika 29. Emisijski spektri spoja **3** univerzalnim puferima različitih vrijednosti pH

Slika 30. prikazuje kalibracijsku krivulju na kojoj se vidi ovisnost maksimuma intenziteta fluorescencije o pH vrijednosti. Povlačenjem Boltzmannove krivulje kroz dobivene točke se može odrediti točka infleksije, koja u ovom slučaju iznosi 7,8. U toj točki se nalazi tzv. uvjetna pK_a vrijednost. Njezino značenje je u tome što govori o idealnom rasponu pH vrijednosti u kojima spoj može imati senzorsku aktivnost. pK_a vrijednost spoja **3** od 7,8 daje mogućnost primjene u živom organizmu, zbog bliskosti pH vrijednosti sa fiziološkom otopinom.



Slika 30. Ovisnost intenziteta fluorescencije o vrijednosti pH za spoj **3**

Kiselo-bazna svojstva za spoj **8** su zbog nedovoljne količine spoja ispitana samo za 3 granične pH vrijednosti. Apsorpcijski i emisijski spektri su prikazani na **slici 31**.



Slika 31. a) Apsorpcijski i **b)** emisijski spektri spoja **8** u različitim pH vrijednostima

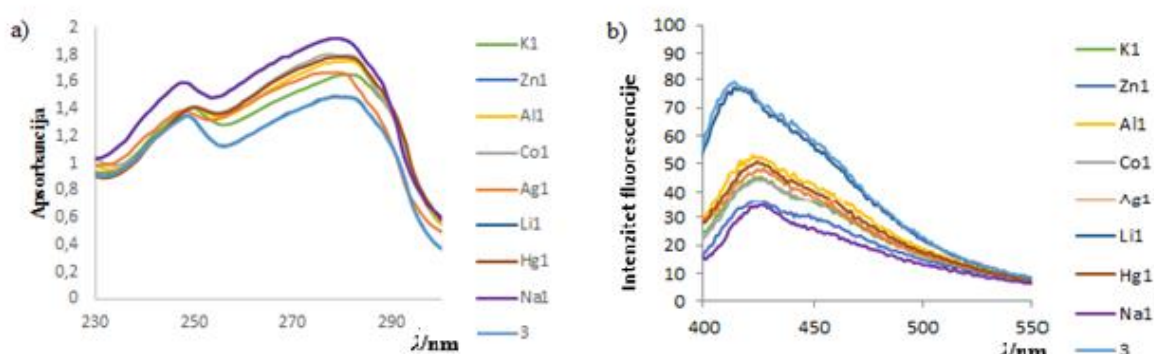
Iz apsorpcijskog spektra se vidi da su maksimumi apsorpcije za pH vrijednosti 2,15 i 7,85 nalaze na 272 nm, dok je na maksimumu za pH vrijednosti od 12,58 došlo do blagog batokromnog pomaka do valne duljine od 305nm. Na emisijskim spektrima je maksimum intenziteta fluorescencije na 446 nm te se uočava gašenje fluorescencije na niskoj vrijednosti pH.

Zbog nedovoljne količine podataka je teško izvesti točne zaključke o senzorskoj aktivnosti spoja **8** kao pH senzora. Dobiveni rezultati, pogotovo promjene oblika apsorpcijskog spektra, upućuju da bi bilo zanimljivo provesti daljnja istraživanja u ovom području.

4.2.3. Utjecaji različitih metalnih iona

Provedena je spektroskopska analiza spojeva **3** i **8** u otopinama različitih metalnih iona kako bi se ispitala senzorska aktivnost na iste. Za spoj **3** su ispitani utjecaji Zn^{2+} , K^+ , Al^{3+} , Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ , Hg^{2+} , te Ag^+ iona dok su za spoj **8** zbog nedovoljne količina sintetiziranog spoja ispitani utjecaji samo Ag^+ , Zn^{2+} i Al^{3+} iona. Dosadašnja ispitivanja provedena sa spojevima koji u svojoj strukturi također sadrže triazolni prsten su pokazala mogućnosti stvaranja kompleksa sa metalnim ionima. Prilikom povezivanja metalnog iona sa ispitanim spojem, dolazi do promjene u energijskim nivoima osnovnog i pobuđenog stanja što rezultira promjenom na

apsorpcijskim i emisijskim spektrima. Na **slici 32.** su prikazani apsorpcijski i emisijski spektri spoja **3**.

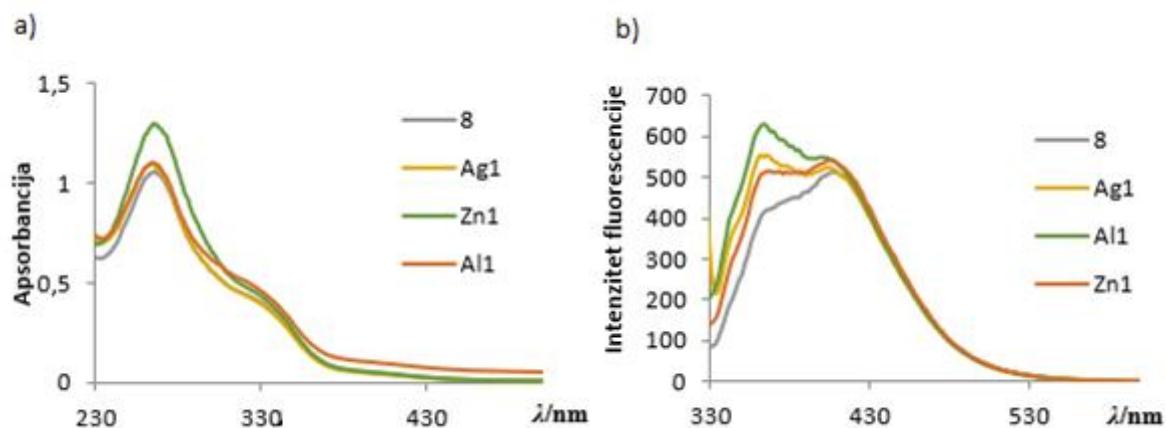


Slika 32. Apsorpcijski a) i emisijski b) spektar spoja 3 u otopinama sa različitim metalnim ionima

Apsorpcijski maksimum za sve metale se pojavljuje na dvije valne duljine, 249 nm i 280 nm. Kompleksiranjem spoja sa metalnim ionima dolazi do povećanja apsorpcije. Najmanji porast apsorpcije u odnosu na čisti spoj uzrokuje kompleksiranje spoja sa K^+ ionom, a najveći porast kompleksiranje sa Na^+ ionom.

Intenzitet fluorescencije za sve komplekse, osim onoga sa natrijevim ionom, ima maksimum na 423 nm. Pri kompleksiranju svih metalnih iona na spoj **3** dolazi do prigušivanja fluorescencije. Najslabije prigušivanje se događa vezanjem cinkovog iona, gdje je emisijska krivulja vrlo bliska krivulji čistog spoja. Kompleksiranjem natrijevog iona dolazi do najjačeg prigušenja.

Apsorpcijski i emisijski spektri spoja **8** u otopinama sa različitim metalnim ionima su prikazani na **slici 33.**



Slika 33. Apsorpcijski a) i emisijski b) spektar spoja **8** u otopinama sa različitim metalnim ionima

Iz **slike 33.** se vidi da je maksimum apsorpcije spoja **8** u kompleksu sa sva tri ispitana metala na 269 nm. Čisti spoj **8** pokazuje najmanju apsorpciju te kompleksiranjem dolazi do njezinog povećanja.

Emisijski spektri pokazuju pravilnu promjenu oblika krivulje za sve komplekse. Svi emisijski spektri pokazuju maksimum intenziteta fluorescencije na 416 nm, no kompleksiranjem spoja se pojavljuje novi signal na 366 nm. Ovakva promjena oblika krivulje može upućivati na senzorsku aktivnost. Da bi se utvrditi sa većom točnošću, potrebno je provesti daljnja ispitivanja u ovome smjeru.

5. Zaključak

- U ovom radu su uspješno sintetizirani su 2-[(4-nitro)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **3**), 4-aminobenzaldehid (spoj **4**), 2-[(4-amino)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **5**), 2-[(4-azido)benz-2-iliden)amino]benzimidazol (spoj **6**) i 2-{4-[(4-fenil)-1,2,3-triazol-1-il]benzilidenamino}benzimidazol (spoj **8**) metodama klasične organske kemije i „click“ kemije
- ^1H -NMR spektroskopijom su potvrđene strukture spojeva **3**, **4**, **5** i **8**, a ^{13}C -NMR spektroskopijom su potvrđene strukture spojeva **4** i **8**
- Spoj **3** je detaljno okarakteriziran apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u svrhu razvoja novih optičkih kemosenzorskih molekula.
- Ispitana su spektroskopska svojstva spoja **3** u različitim otapalima, univerzalnim puferima različitih pH vrijednosti te u prisustvu različitih metalnih iona. Zbog nedovoljne količine spoja **8**, njegova spektroskopska svojstva su ispitna graničnim vrijednostima pH te u prisustvu Ag^+ , Zn^{2+} i Al^{3+} iona
- Spoj **3** zbog izražene fluorescencije u vodi, dimetil-sulfoksidu, acetonu i acetonitrile u odnosu na spektre u drugim otapalima ima potencijalno senzorsko djelovanje. Također se potencijalno može koristiti kao pH senzor u neutralnim i lužnatim pH vrijednostima
- Spoj **3** ne pokazuje zadovoljavajuću senzorsku aktivnost za detekciju ispitanih metalnih iona.
- Spoj **8** je potrebno dodatno ispitati kako bi se utvrdila senzorska aktivnost.

6. Literatura

- [1] Thévenot. D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson. G. S., *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*, Pure & App. Chem., **71**(1999) 2333-2348.
- [2] Valeur B., *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*, Wiley, Weinheim, Federal Republic of Germany (2001) 273-279
- [3] Škorić I., *Molekulska spektroskopija*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, nastavni tekst, Zagreb., 27-46
- [4] Kolb H.C., Finn M., Sharpless K.B., *Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions*, Angew. Chem. Int. Ed., **40**(2011)2004-2021.
- [5] Jean-François Lutz, Zoya Zarafshani, *Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide–alkyne “click” chemistry*, Elsevier **60**(2008) 958–970
- [6] Demchenko, A.P., *Introduction to fluorescence sensing*, Anal. Bioanal. Chem., Analytical and Bioanalytical Chemistry, (2009) XXI
- [7] Bojinov, V., Georgiev N., *Molecular sensors and molecular logic gates*, J. of the University of Chemical Technology and Metallurgy, **46** (2011) 3-26
- [8] Valeur B., *Molecular Fluorescence. Principles and Applications.*, Wiley, Weinheim, Federal Republic of Germany (2001) 273-279
- [9] Bojinov, V., Georgiev N., *Molecular sensors and molecular logic gates*, J. of the University of Chemical Technology and Metallurgy, **46** (2011) 3-26
- [10] Steinberg Murković I., *Kemijski senzori i biosenzori*, nastavni tekst, Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
- [11] Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., *Chemical sensors: definitions and classification*, Pure & Applied Chemistry, **63** (1991), 1247-1250.
- [12] Bojinov, V., Georgiev N., *Molecular sensors and molecular logic gates*, J. of the University of Chemical Technology and Metallurgy **46** (2011) 4
- [13] Demchenko, A.P., *Introduction to fluorescence sensing*, Anal. Bioanal. Chem., Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer, (2009). XII
- [14] Valeur, B., *Molecular Fluorescence. Principles and Applications.*, Wiley, Weinheim, Federal Republic of Germany, 2001, 21
- [15] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy, third edition*, Springer, **1**(2006) 5.

- [16] Valeur, B., *Molecular Fluorescence. Principles and Applications.*, Wiley, Weinheim, Federal Republic of Germany (2001) 34-42
- [17] Škorić I., *Molekulska spektroskopija*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, nastavni tekst, Zagreb. 33-34
- [18] Albinsson, B., Eng, M.P., Pettersson, K., Winters, M.U., *Electron and energy transfer in donor–acceptor systems with conjugated molecular bridges*, Phys. Chem. Chem. Phys. **9** (2007), 5847-5864
- [19] Hranjec, M., Horak, E., Tireli, M., Pavlović, G., Karminski-Zamola, G., *Synthesis, crystal structure and spectroscopic study of novel benzimidazoles and benzimidazo[1,2-a]quinolines as potential chemosensors for different cations*, Dyes and Pigments **95**(2012), 645,646
- [20] Kaura, A., Sharma, L., Kaura, M., *Synthesis and Comparative Antimicrobial Study of Schiff bases and Beta-lactam Derivatives*, Int. J. Chem. Sci ,2012 Vol. 2 (**6**) 140-143
- [21] Abu Dief, A., Mohamed, I., *A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases*, Elsevier Vol 2. **4** (2015) 119-133
- [22] Hoebe, F.J., Jonkheijm, P., Meijer, E.W., Schenning, A.P., *About supramolecular assemblies of π -conjugated systems*, Chem. Rev., **105**(2005)1491-1546.
- [23] URL: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>(pristup 19.3.2017.)
- [24] Škorić I., *Molekulska spektroskopija*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, nastavni tekst, Zagreb.33, 39
- [25] Kamijo, S., Jin, T., Huo, Z., Yamamoto, Y., *A one-pot procedure for the regiocontrolled synthesis of allyltriazoles via the Pd-Cu bimetallic catalyzed three-component coupling reaction of nonactivated terminal alkynes, allyl carbonate, and trimethylsilyl azide*, J. Org. Chem., **69**(2004) 2386-2393.
- [26] Yu Heng Lau, Rutledge J., Watkinson M., Todd Matthew H., *Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles*, Chem. Soc. Rev. (2011) **40**, 2848–2866
- [27] Bryant, J. J. and Bunz, U. H. F. (2013), *Click To Bind: Metal Sensors*. Chem. Asian J., 8: 1354–1367
- [28] Skoog, D., West, D. , Holler, F., Crouch, F, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, New York: Saunders College Pub 2013.
- [29] Pine, S. H., *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, (2001) str. 1063, 1113, 1114.
- [31] Owen, T., *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*, Primer, Agilent Technologies, **2**(2000) 77-78.
- [32]] Valeur, B., *Molecular Fluorescence. Principles and Applications.*, Wiley, Weinheim, Federal Republic of Germany, (2001) 274

- [33] Demchenko, A.P., *Introduction to fluorescence sensing*, Anal. Bioanal.Chem. (2009). XII., 2009. **395** (5) 1195-1196.
- [34] Valeur, B., Leray, I., *Design principle of fluorescent molecular sensors for cation recognition*, Coord. Chem. Rev., **205** (2000), 3-40
- [35] Demchenko, A.P., *Mechanisms of Signal Transduction*, in *Introduction to Fluorescence Sensing*. Springer(2009) 249-259.
- [36] Valeur, B., Leray, I., *Design principle of fluorescent molecular sensors for cation recognition*, Coord. Chem. Rev, **205** (2000), 7-8
- [37] Bojinov, V., Georgiev N., *Molecular sensors and molecular logic gates*, J. of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 2011., 5
- [38] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy, third edition*, Springer, **9** (2006) 334-335.
- [39] Jean-François Lutz, Zoya Zarafshani, *Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide–alkyne “click” chemistry*, Adv Drug Deliv Rev **60**(2008) 958–970
- [40] Kolb, H.C., Finn, M., Sharpless, K.B., *Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions*, Angew. Chem. Int. Ed., **40**(2011)2004-2021.
- [41] Daq, A., Durmaz, H., Kirmizi, V., Hizal, G.,Tunca, U., *An easy way to the preparation of multi-miktoarm star block copolymers via sequential double click reactions*, Polym. Chem., **1** (2010) 621-623.
- [42] Marrocchi A., Facchetti A., Lanari D., Santoro S., Vaccaro L., *Click-chemistry approaches to π -conjugated polymers for organic electronics applications*, Royal Society of Chemistry, 2016., 1-2
- [43] Yu Heng Lau, P. Rutledge, M. Watkinson, M. H. Todd, *Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles*, Chem. Soc. Rev., 2011, **40**, 2848–2866
- [44] Jean-François Lutz, Zoya Zarafshani, *Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide–alkyne “click” chemistry*, Adv Drug Deliv Rev **60** (2008) 958–970
- [48] Christopher D. Hein, Xin-Ming Liu, Dong Wang, *Click Chemistry a Powerful Tool for Pharmaceutical Science*, Pharm Res. **25**(10) (2008) 2216-2230
- [46] Hein, J. E., Valery, V. F., *Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides*, Chem Soc Rev., **39**(2010) 1302-1315.

- [47] Liang L., Astruc D., *The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview.*, *Coord. Chem. Rev.* **255** (2011) 2933– 2945
- [48] URL: <http://orgsyn.org/demo.aspx?prep=cv2p0130>(pristup: 19.3.2017.)
- [49] Reichardt, C. *Solvent Effects on the Absorption Spectra of Organic Compounds, in Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, Third Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG. (2002), 360-361, 385
- [50] Reichardt, C., *Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators*, *Chem. Rev.* 1994, 2319-2358

7. Životopis

gdje sam završio Osnovnu školu Dobriše Cesarića . Također, u Požegi sam završio i srednju školu „Gimnazija Požega“, prirodoslovno-matematički smjer. 2010. godine sam upisao preddiplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Godine 2014. sam obranio završni rad iz polja analitičke kemije pod nazivom „Razvoj kromatografske metode za određivanje fluorokinolona u morskoj vodi“ pod vodstvom dr. sc. Sandre Babić, te time stekao titulu prvostupnika ekoinženjerstva. Iste godine sam upisao diplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Od rujna 2016. do siječnja 2017. sam pohađao studentsku razmjenu u Bratislavi, Slovačka preko CEEPUS programa na sveučilištu „Slovak University of Technology“, na odjelu „Department of Automation and Control“